

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究

平成 24 年度～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 新見伸吾

平成 27 (2015) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告	
革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究	1
新見 伸吾	
II. 分担研究報告	
1. プロテオミクス解析を利用した医用材料の生体適合性・機能評価に関する研究	30
齧島 由二	
2. 医用材料の血液適合性を含む生体適合性における細胞応答に関する研究	42
宮島 敦子	
3. 細胞内タンパク質発現解析を利用した医用材料の血液適合性評価に関する研究	71
加藤 玲子	
4. 遺伝子発現の網羅的解析を利用した医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験	84
澤田 留美	
5. 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討	105
植松 美幸	
6. アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析	112
河上 強志	
7. タンパク質吸着の動力的解析	118
河上 強志	
8. 材料表面近傍の水和状態とタンパク質吸着挙動解析	127
石原 一彦	
9. 中間水コンセプトによる新規生体適合性高分子の合成	148
田中 賢	
10. 国際標準歯科インプラント材料の有効性及び安全性評価に関する研究	155
佐々木 啓一	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表
研究成果の刊行に関する一覧表（雑誌）

161

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

総合研究報告書
厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

研究代表者 新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部長

研究分担者 藪島由二 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第一室長
宮島敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第二室長
加藤玲子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官
澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第二室長
植松美幸 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官
河上強志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官
石原一彦 東京大学大学院 工学系研究科 教授
田中賢 山形大学大学院理工学研究科 教授
佐々木啓一 東北大学大学院 歯学研究科 科長

研究要旨

近年、材料/細胞界面特性を支配する主要因子である水和状態、イオン及び蛋白質吸着挙動等は、医用材料が持つ血液適合性や骨親和性のほか、力学的特性にも関与することが明らかになりつつある。本研究では、これら支配因子の他、材料上で培養した細胞の挙動を分子レベルで詳細に検討後、医用材料が示す生物学的特性等との相関の総合的な検証により、各因子を指標とした医用材料の血液適合性を含めた生体適合性を *in vitro* で評価する簡易スクリーニング系を開発することを目的として検討を行っている。

血液適合性等の異なる様々な材料について基礎データの取得及び検証実験を行った結果、各種材料の血液適合性等は表面化学状態、表面に吸着する血漿蛋白質の種類と量、結合・解離速度定数のほか、材料上で培養した細胞の蛋白質発現挙動を指標として評価できる可能性を見出した。また、チタンの $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理により高いアパタイト形成能が付与され、hMSC の骨分化誘導が促進されることが明らかになった。既存試験法の予備的検証実験においては、本邦通知（薬食機発 0301 第 20 号、平成 24 年 3 月）及び、現在、改訂作業が進められている ISO/WD 10993-4.2（血液適合性試験）に掲げられている試験項目について基礎的検討を基に妥当性評価を行った結果、高分子材料の血液適合性は TAT 及び -TG を指標として評価できる可能性が示された。また、血液適合性と密

接に関与する中間水の存在の有無は、材料表面近傍の水和状態に着目した分子動力的シミュレーションにより予測できる可能性が示された。高分子材料に対する蛋白質吸着の抑制には、蛋白質の離脱時の分子間相互作用を誘起しない表面の設計が重要であること、ポリマーの一次構造の制御により中間水を制御することが可能であることが判明した。歯科インプラントに関する研究では、歯科用インプラントの承認審査で行うべき疲労試験のワーストケース設定に関する考えについて、「課題解決に向けた提言」として取りまとめ、ワーストケース選定のためのフローチャート案（ISO 14801 準拠）の提案を行った。

A. 研究目的

身体と接触する医療機器及び医用材料の生体適合性は、種々の溶出物及び残留物等に由来する各種毒性、微生物汚染に由来する感染性因子の他、材料表面の物理学的特性に大きく影響される。これは医用材料が細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その界面（バイオインターフェイス）で起こる分子間相互作用を介して機能を発揮することに由来する（図1）。医用材料を生体内に埋植すると、材料表面に水やイオンが速やかに吸着し、次いで生体蛋白質の吸着が起こる。すなわち、医用材料と細胞は吸着蛋白質層を介して相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与すると考えられている。近年、材料/細胞界面特性を支配する主要因子である水和状態、イオン及び蛋白質挙動等は、材料が持つ血液適合性や骨親和性の他、力学的特性にも関与することが明らかになりつつある。そこで本研究では、これらの諸因子と材料の生物学的特性との相関性を解明し、新規医療機器の安全性と有効性を評価するための新たな簡易評価法として応用すると共に、製品開発における材料選択を支援することを目指

して検討を行なっている。

一方、臨床現場において生体適合性が問題となる医療機器の中で、循環器系医療機器はその他の医療機器と比較して圧倒的に使用頻度が多く、長期間にわたって血液凝固や血栓等を起こさないことが要求される。また、歯科インプラント分野においては新規製品の開発が顕著化しているが、検査方法や国内外の審査基準の相違等に由来するデバイス・ラグを解消することが大きな課題となっている。

本研究では、血液適合性を含めた生体適合性の異なる様々な材料について、材料/細胞界面特性を支配する水和状態、材料への蛋白質吸着及び高分子材料の化学構造及び一次構造、ISO/WD 10993-4（血液適合性試験）に掲げられている試験項目の妥当性評価等並びに材料上で培養した細胞の遺伝子及び蛋白質の発現状態等について検討した。さらに、歯科用インプラントの疲労試験におけるワーストケースの選定の考え方について、科学的な根拠に基づく学術的な研究による承認審査基準の解釈の統一を目指した検討を行った。

本研究の成果は医療機器の開発及び厚生行政に大きく貢献することが期待され

る。

B. 研究方法

研究方法の概略を以下に記載する。詳細については各分担研究報告書を参照のこと。

(1) 新規材料の物理化学的特性評価

ATRP 法によりシリコン基板、シリカ粒子及び金表面に MPC、CBMA、SBMA、HEMA、mOEGMA、TMAEMA 及び BMA のポリマーブラシを形成し、X 線光電子分光、分光エリプソメーター及び AFM 等により表面構造及び特性、NMR により水和構造、AFM フォースカーブにより表面相互作用、AFM フォースカーブ及び QCM-D により及び蛋白質との相互作用を解析した(石原)。

(2) 材料 / 細胞界面特性に着目した新規血液適合性評価法の開発

プロテオミクス解析を用いた血液適合性評価マーカの探索に関する研究では、血液適合性の異なる 23 種類の材料、DLC 系ステント材料及び新たに合成された生体適合性高分子に吸着するヒト血漿蛋白質を試料として、LC-MS/MS (LTQ/OrbiTrap 又は Q-Exactive/Advance Nano UPLC) を用いた網羅的比較定量解析及び絶対定量により、マーカ蛋白質の選定と検証を行った(藪島)。アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析では、チタンにカルシウムを導入し、表面形状及び表面化学状態を解析した。蛋白質吸着の動力学解析に関する研究では、水晶板上にスピコンコートを用いて PMEA、PHEMA 及び MEA/

HEMA ランダム共重合体等をコーティングした QCM センサーと種々の濃度の ALB、FIB、FINC 及び VTNC との相互作用を緩和法により測定し、その QCM センサーグラムから、データ解析ソフトウェア (AQUA Ver.2.0) を利用して結合速度定数、解離速度定数、結合定数及び解離定数を算出した(河上)。分子シミュレーションを用いた材料表面の水和状態の解析に関する研究では、PMEA に含まれる酸素原子に対する水分子の配置、水の吸着エネルギーを比較し、さらに中間水が存在するとされるメトキシ基の酸素原子に対する水の相対速度、官能基周辺の水分子の捕捉時間等を調べた(植松)。血液適合性試験では、PET、PP あるいは PP-low bind チューブ中で PC、PMEA、PHEMA、MEA/HEMA ランダム共重合体材料、PTHFVE、PEOEVE 及び PMe3A を浸漬した用時調製ヘパリン加ヒト血液の補体 (C3a、C5a、SC5b-9)、血小板 (-TG) 及び血液凝固系 (TAT) の蛋白質量を市販 ELISA により測定した(宮島)。regio 選択的な閉環メタセス重合法 (ROMP) を用いてエチレングリコール構造を主鎖または副鎖に導入した新規ポリマーを合成し、DSC 法により中間水を、ヒト血小板粘着試験により抗血栓性を評価した(田中)。

(3) 細胞挙動解析

PMEA、PHEMA、MEA/HEMA ランダム共重合体、PMe3A、PTHFVE、PEOEVE の材料上で、hMSC、THP-1 細胞、HUVEC、TIME-GFP を常法に従って 1 日間又は 4 日間培養して、細胞内の遺伝子発現挙動解析を実施した。

また、カルシウム導入処理をしたチタン表面上で hMSC を 1 日培養し、細胞内の遺伝子発現解析を実施した。遺伝子発現プロファイルの解析においては、培養細胞から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を調製し、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて mRNA 発現を網羅的に測定した後、GeneSpring GX 12.5 ソフトウェアによる統計学的・生物学的解析及び IPA を用いたパスウェイ解析を実施した(澤田)。蛋白質発現挙動の解析においては、TCPS、PET を PMEA および MEA/HEMA ランダム共重合体でコートした上で hMSC を常法に従って 2 日間培養し、TCPS、PC を PMEA、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PEOEVE でコートした上で THP-1 を常法に従って 1 日間又は 2 日間培養して、蛋白質発現網羅的解析、活性化マーカー蛋白質及び IL-8 の発現解析を実施した。蛋白質発現網羅的解析においては、PBS で洗浄した細胞を細胞溶解液に溶解し、2D clean kit による精製、蛋白質定量、還元、アルキル化及び脱塩した試料を Nano LC/MS/MS ショットガン解析に供した後、PD v1.3/Mascot/SwissProt データベース解析により蛋白質を同定し、SIEVE 2.0 ソフトウェアを用いて多変量解析を行った。活性化マーカー蛋白質の発現解析においては、冷 FACSBuffer で洗浄後、ヒト グロブリン、さらに FITC 標識した抗活性化マーカー蛋白質抗体あるいはコントロール IgG1 とインキュベーションした THP-1 細胞を Flow Cytometry で解析した。THP-1 細胞培養上清中の IL-8 の量は市販の ELISA キットを用いて測定した(加藤)。

(4) 歯科用インプラントに関する研究

アカデミア、独立行政法人医薬品医療機器総合機構、日本歯科材料工業協同組合が連携し、歯科インプラントの機械強度に係る疲労試験のワーストケース設定やインプラント表面処理方法等に関する考え方について、審査側と申請者側で問題と考えている事項を把握し、明確な科学的エビデンスに基づき検討した。また、疲労試験におけるワーストケース設定に関し、FEM を用いた実験を行った(佐々木)。

2. 倫理面の配慮

本研究に用いた hMSC、HUVEC、TIME-GFP 及び THP-1 細胞は、市販品であり、倫理的に問題はないと考えられる。ヒト血液を用いる実験では国立医薬品食品衛生研究所研究倫理委員会規定に従って実施している。

C. 研究結果

研究結果の概略を以下に記載する。詳細は各分担研究報告書に記載の通りである。

(1) 新規材料の物理化学的特性評価

イオン性ポリマーブラシ表面での水分子の自己拡散定数は非常に小さい値であった。カチオン性及びアニオン性側鎖を有する同種ブラシ表面では純水中で 100 nm 以上の距離から強い排斥が観測された。BSA の吸着量を BSA の理論単層吸着量と比較すると、双性イオン型及び非イオン型ポリマーブラシ表面でははるかに下回ったが、イオン性ポリマーブラシ表面では上回った。BSA とカチオン性側鎖を有す

るポリマーブラシ表面の相互作用、Lysと疎水性の側鎖及びアニオン性の電位を有するポリマーブラシ表面の相互作用は強かった。カルボキシル基、アミノ基、メチル基との相互作用は、双性イオン性側鎖を有するブラシ表面ではいずれも低く、カチオン性側鎖を有するブラシ表面ではカルボキシル基と強く、疎水性の側鎖を有するブラシ表面ではメチル基とアミノ基と強く、アニオン性の側鎖を有するブラシ表面ではいずれとも相互作用を示さなかった(石原)。

(2)材料/細胞界面特性に着目した新規血液適合性評価法の開発

プロテオミクス解析を用いた血液適合性評価マーカの探索に関する研究では、網羅的プロテオミクス解析により13種類の血液適合性マーカ候補を選定し、標的プロテオミクス解析によりそのマーカ候補から8種類が利用できる可能性を見出した。血管ステントの新たな金属材料である SUS/30%F/DLC に対する血液適合性評価マーカ候補蛋白質の吸着はその他の材料と比較して顕著に抑制されることが判明した。また、蛋白質吸着挙動から判定した新規高分子材料の血液適合性は PMEA=PTHFVE>>PEOEVE>PHEMA>UHMWPE>>PM E₃A の順になることが明らかになった(靛島)。アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析では、Ca(OH)₂処理によりチタン表面に水に不溶性のチタン酸カルシウムが形成された。蛋白質吸着の動力学解析に関する研究では、どの蛋白質においても結合定数及び結合速度定数は汎用ポリマー (PET、PBT、PA6及び PA66)

より生体適合性ポリマー (PHEMA、PMEA 及び HEMA/MEA ランダム共重合)のほうが小さく、解離定数及び解離速度定数は、汎用ポリマーより生体適合性ポリマーのほうが大きく、その傾向は特に FIB 及び VTNC で顕著であった(河上)。分子シミュレーションを用いた材料表面の水和状態の解析に関する研究では、PMEA のエステル結合カルボニル酸素原子はメトキシ基の酸素原子に比べて水分子の吸着エネルギーが大きく、水分子を取り込みやすいことが示された。さらに、材料に吸着させた水分子に対し、周りに飽和状態で水分子を配置したうえでシミュレーションを行ったところ、エステル結合カルボニル酸素原子に吸着させた水分子は周りの水分子に比べて動きが拘束される傾向にあり、これによって不凍水を表現する可能性が示唆された。メトキシ基近くにとどまり続ける水と遠くに存在し続ける水があることが判明し、これが中間水にあたると思われた(植松)。医用材料の血液適合性試験では、補体系マーカ (C3a、C5a、SC5b-9) で陽性対照と陰性対照シートにおける差が観察されなかったのに対し、TAT 及び -TG では陽性対照シートで増加し、HEMA/MEA シートでは MEA の増加に伴い減少し、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE の順番で低下した(宮島)。中間水コンセプトによる新規生体適合性高分子の合成に関する研究では、エチレングリコールユニット数の増加に伴い中間水の増加が観察され、0.01g/g 以上の中間水の存在で血小板の粘着が抑制された(田中)。

(3)細胞挙動解析

CaCl₂処理に比べ Ca(OH)₂処理をしたチタン表面上で1日培養した hMSC のほうが、骨分化関連遺伝子の発現増加の程度が顕著に高かった。hMSC において、細胞を運動性や未分化性の維持に関与する EMT Pathway の亢進が PMEA、PHEMA、MEA/HEMA コポリマーで認められ、Notch 誘導による EMT Pathway の亢進は PMEA のみにより顕著に亢進された。THP-1において、遺伝子群の発現変化が疾病関連機能及び生体機能に及ぼす影響について調べた結果、PMEA で上昇する機能が多いのに対し MEA が低下する機能が多く、コポリマーで影響を受ける機能は少なかった。TIME-GFP で同様に調べた結果、PMe3A で “Glucose metabolism disorder” など4種類が上昇し、“differentiation of cell” など8種類が低下、PEOEVE で “aortic disorder” など3種類が上昇し、“differentiation of epithelial cells” など25種類が低下、PMEA で “proliferation of hematopoietic progenitor cells” など2種類が上昇し、“development of head” など2種類が低下した(澤田)。hMSC における発現蛋白質は PET、PMEA、PHEMA、MEA/HEMA コポリマーで細胞の集合及び組織化や細胞機能と維持に関わる機能に関連する蛋白質が多く変動したが、その方向性及び程度は材料により大きく異なった。THP-1細胞においては、PMEA で炎症系、血液凝固関連及び細胞形態や接着に関与する一群の蛋白質誘導が低下する傾向が認められた。また、CD54の発現は TCPS を対照とすると PMe3A、PEOEVE で2倍以上増加したが、CD86の発現はほとんど変わらなかった。

た。一方、培養上清中の IL-8の量は、PMe3A>>PEOEVE>> PMEA>PTHFVE > PHEMA の順番であった(加藤)。

(4) 歯科用インプラントに関する研究

疲労試験のワーストケースの選定の基本的な考えについて、インプラント形状における長さ、径、アングルの有無、嵌合機構等の形状に関して審査基準に関する考え方を取りまとめると共に、FEMに加えて静的荷重試験を加えることを検討し、ワーストケース選定のためのフローチャート案を取りまとめて提案した(佐々木)。

D. 考察

(1) 新規材料の物理化学的特性評価

イオン性ポリマーブラシ表面において、水分子がポリマー鎖と強く相互作用し、その運動性が抑制されること、同種ブラシ表面における斥力は静電的な相互作用に由来することが示された。BSA は生理的条件下で負に荷電していることから、多層吸着層の形成はカチオン性ポリマーブラシ表面との静電的な相互作用によると考えられる。ポリマーブラシ表面と蛋白質の相互作用において、単層以下での吸着量は両者の直接的相互作用により決まるため吸着量と吸着力は相関するのに対し、多層の吸着量は表面に吸着した全ての蛋白質を評価するため相関しないと考えられること、両者の静電的あるいは疎水的相互作用は、接触後の離脱を妨げる力として働いていることが明らかになった。バイオマテリアルにおいて、蛋白質との非特異的な相互作用を排除するためには、官能基レベルの相互作用を回避する必要のあることが示された(石原)。

(2)材料 / 細胞界面特性に着目した新規血液適合性評価法の開発

プロテオミクス解析を用いた血液適合性評価マーカの探索に関する研究では、血液凝固に関与するタンパク質群をマーカ候補として選定した。当該マーカ蛋白質の吸着挙動を指標として評価した DLC 系ステント材料の血液適合性は、過去に報告された *in vitro* 試験、動物実験及び臨床成績と一致したほか、新規高分子材料の血液適合性も蛋白質吸着特性から予測できることが示唆されたことから、材料表面の蛋白質吸着挙動に着目した解析法は医用材料の血液適合性を予測・評価するための新たな *in vitro* 試験法として妥当且つ有用であることが示唆された（靄島）。アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析では、チタンへの $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理による高いアパタイト形成能の付与は、水に不溶のチタン酸カルシウムの形成によるものであり、それには早期のリン酸イオンの吸着の関与が示唆された。蛋白質吸着の動力的解析に関する研究では、特に FIB 及び VTNC の吸着挙動により高分子材料の血液適合性をスクリーニングできる可能性が示された（河上）。分子シミュレーションを用いた材料表面の水和状態の解析に関する研究では、本法は MEA50 量体周辺に存在する水分子が不凍水であるかの指標として使える可能性、水分子の補捉時間により中間水を示しうる可能性が見いだされた（植松）。血液適合性試験については、血液適合性が低い高分子材料でマーカ蛋白質産生量が

増加し、血液適合性が高い材料においてマーカ蛋白質産生量が減少した TAT 及び β -TG が、評価試験として適している可能性が示された（宮島）。中間水コンセプトによる新規生体適合性高分子の作成に関する研究では、中間水は不凍水と蛋白質との接触を抑制し、不凍水による吸着タンパク質の構造変化を低下させることにより、高分子材料の血小板への吸着を低下させたと考えられる（田中）。

(3)細胞挙動解析

CaCl_2 あるいは $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理をしたチタン表面上での hMSC の骨分化関連遺伝子の発現プロファイルの違いは、チタン表面のカルシウムイオン導入量及びアパタイト形成量の違いによる可能性が示された。EMT の誘導により細胞の運動性の亢進や細胞外基質の蓄積、細胞老化の抑制、幹細胞用機能（未分化性等）の獲得などが示されており、MEA/HEMA コポリマーコーティング材料が hMSC におけるこれらの機能へ影響を及ぼす可能性が示唆された。一方、THP-1 細胞においては疾病関連機能や生体機能に関連する遺伝子群に対し、PMEA と PHEMA は相反する作用を示すことが示唆された。TIME-GFP においては、コーティングするポリマーの種類により血管内皮細胞の機能に与える影響は異なることが示された（澤田）。材料による hMSC における発現蛋白質の違いは、材料表面への吸着蛋白質の種類や量の違いによるものと考えられる。THP-1 細胞については PMEA が血液凝固及び炎症を促進する可能性は低いこと、血液適合性が高いことが

示されている高分子材料で CD54 の発現は低く、ほぼ同様の傾向が IL-8 で観察されることが明らかになった（加藤）。

(4) 歯科用インプラントに関する研究

疲労試験におけるワーストケースの選定には、フローチャートのような考え方の導入により、合理的かつ効率的な判断が可能となり審査の問題点の一部の改善につながるものと考えられる。申請者側に対しては、機械強度に関して科学的根拠に基づき説明可能な資料の作成の必要性が示された（佐々木）。

E. 結論

(1) 新規材料の物理化学的特性評価

材料表面の違いにより、材料表面間における相互作用、表面近傍の水の運動性、蛋白質との相互作用は異なることが示され、蛋白質の離脱時の分子間相互作用を誘起しない表面の設計が蛋白質吸着に重要であることが明らかになった。引き続き NMR 及び AFM フォースカーブを基盤技術として、材料表面近傍の水和状態と蛋白質吸着挙動解析を高分解能で解析できる方法論を開発する必要がある（石原）。

(2) 材料 / 細胞界面特性に着目した新規血液適合性評価法の開発

プロテオミクス解析を用いた血液適合性評価マーカの探索に関する研究では、医用材料の血液適合性は、その表面に吸着する血漿蛋白質の種類及び量から予測・評価できることが示唆された。今後、選定されたマーカ蛋白質の有用性を更に検証するため、標的プロテオミクスによる絶対定量を行う（靄島）。アパタイト

形成におけるイオン吸着挙動の解析では、チタンを $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理することによる高いアパタイト形成能の付与は、チタン酸カルシウムの形成によることが示唆された。蛋白質吸着の動力的解析に関する研究では、QCM センサーを用いた FIB 及び VTNC に対する吸着挙動の動力的解析により高分子材料の血液適合性をスクリーニングできる可能性が示された。引き続き血栓性試験用材料をコーティングした QCM センサーを作製し、蛋白質の吸着試験方法を開発する必要がある（河上）。分子シミュレーションを用いた材料表面の水和状態の解析に関する研究では、PMEA 中に含まれる酸素原子に対する強制的な水素結合の形成時における吸着エネルギー比較及び吸着した水分子の拡散の検討により不凍水を示すことができる可能性、算出された酸素原子の周りに存在する水分子の捕捉時間が中間水の存在を示す指標となりうる可能性が示された。中間水の存在状態を判定する指標を選定するため、引き続き幾つかのモデル化合物の表面近傍における水分子の吸着エネルギーと個数を分子動力的シミュレーションにより算出し、比較検討する必要がある（植松）。高分子材料の血液適合性評価において TAT 及び -TG を指標にすることが適している可能性が示された。引き続き生体適合性の異なる高分子材料を用いて、現行の血液適合性試験法に掲げられている血栓形成に係るマーカの特性及び妥当性を総合的に検証する必要がある（宮島）。中間水コンセプトによる新規生体適合性高分子の作成に関する研究では、高分子の一次制御による水和構

造と抗血栓性の制御に成功し、抗血栓性の発現メカニズムを解明するための新たな知見を得ることができた。引き続き主鎖又は側鎖構造を変化させた PMEA 類似体を合成し、DSC 法等を用いて高分子の物理化学的な物性と中間水量との相関性を検討する必要がある(田中)。

以上、材料表面への静的及び動的蛋白質吸着挙動を指標とした評価法並びに材料との接触に伴う血液中の TAT 及び -TG 変動に基づく評価法は、医用材料の血液適合性を予測・評価する新たな *in vitro* 試験法として利用可能であることが示唆された。

(3)細胞挙動解析

CaCl₂処理に比べCa(OH)₂処理をしたチタン表面上で1日培養したhMSCのほうが、骨分化の誘導能は顕著に高いことが明らかになった。hMSCの運動性や未分化性の維持等に関与するEMT Pathwayの亢進が認められ、EMAの割合が高いほうがより亢進されやすい可能性のあることが示唆された。高分子材料がTIME-GFPの機能に及ぼす影響の評価には、網羅的遺伝子解析だけでなく、接着や増殖等他の評価も考慮する必要性が示された(澤田)。様々な高分子材料上で培養したhMSCにおいて細胞の集合及び組織化や細胞機能と維持に関わる機能に関連する蛋白質が多く変動したが、その方向性及び程度は材料により大きく変動した。THP-1細胞の蛋白質発現解析では、PMEAで血液凝固及び炎症を促進する蛋白質群の発現が低いこと、高分子材料の血液適合性評価においてCD54とIL-8が有用である可能性が示された(加藤)。

以上、医用材料の血液適合性は、CD54発現量及びIL-8産生量を指標として評価できる可能性が示唆された。

(4) 歯科用インプラントに関する研究

承認審査で特に問題となっている歯科用インプラントの疲労試験におけるワーストケース設定などについて科学的エビデンスに基づき学術的に検討、整理し、歯科用インプラントが真に具備する要件を再考し、「課題解決に向けた提言」として取りまとめ、ワーストケース選定のためのフローチャート案(ISO 14801 準拠)の提案を行った(佐々木)。

本研究で得られた成果は、将来、JIS及びISO規格として標準化することを視野に入れている。また、歯科分野に係る研究成果として、新たな歯科インプラント材料の審査基準が策定されるため、同材料のデバイス・ラグを解消できることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(論文及び総説)

- 1) Haishima Y, Isama K, Hasegawa C, Yuba T, Matsuoka A. A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration. J. Biomed. Mater. Res.

- Part A, 101:2630-2643 (2013)
- 2) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A. Calcium-incorporated titanium surface influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 101: 2573-2585 (2013)
- 3) Hoshino T, Narukawa Y, Haishima Y, Goda Y, Kiuchi F. Two new sulfated oleanan saponins from *Achyranthes* root. *J. Nat. Med*, 67:386-389 (2013)
- 4) 中村里香, 酒井信夫, 藪島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子. ショットガンブロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131:50-57 (2013)
- 5) Haishima Y, Hasegawa C, Nomura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K, Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, Niimi S. Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 102B:1809-1816 (2014)
- 6) Haishima Y, Kawakami T, Hasegawa C, Tanoue A, Yuba T, Isama K, Matsuoka A, Niimi S. Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 102B: 721-728 (2014)
- 7) 藪島由二. 第1部: 医療機器市場の拡大と新規製品の開発: 開発, 上市化, 市場確保において留意すべきポイント. 生体適合性制御と要求特性掌握から実践する高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略 (監修: 田中 賢). *サイエンス&テクノロジー*, pp.3-21 (2014)
- 8) 新見伸吾, 梅津光夫, 伊関 洋, 岩崎清隆, 笠貫 宏, 原田 昇, 光石 衛, 北森武彦, 鄭雄一, 中岡竜介, 藪島由二. 早稲田大学先端生命科学センター (TWIns) 及び東京大学大学院工学系研究科との連携による革新的医薬品・医療機器・再生医療製品等実用化促進事業. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 132:16-18 (2014)
- 9) 中岡竜介, 藪島由二, 新見伸吾. 医療機器・材料の国際標準化動向. *バイオマテリアル-生体材料*, 33:56-63 (2015)
- 10) Haishima Y, Kawakami T, Fukui C, Tanoue A, Yuba T, Ozono S, Kumada H, Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Fujisawa A, Yamasaki K, Nomura Y, Isama K, Chung U, Ogawa K, Niimi S, Yoshida M. Characterization of alternative plasticizers in polyvinyl chloride sheets for blood containers. *J. Vinyl Add. Technol*, in press (2015)
- 11) Kono K, Takada N, Yasuda S, Sawada R, Niimi S, Matsuyama A, Sato Y. Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human

- mesenchymal stem cells. *Biologicals*, 43:146-149 (2015)
- 12) Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Okura H, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of in vivo tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R null mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regenerative Therapy*, 1:30-37 (2015)
- 13) 澤田留美 . 再生医療等製品開発における動物実験 指針及び評価指標について . *オペリスク*, 20 : 25-31 (2015)
- 14) 澤田留美 . 再生医療等製品とバイオマテリアル ,そして評価指標 . *バイオマテリアル 生体材料* , 33 : 7-8 (2015)
- 15) Sasaki H, Takeuchi I, Okada M, Sawada R, Kanie K, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Label-free morphology-based prediction of multiple differentiation potentials of human mesenchymal stem cells for early evaluation of intact cells. *PLOS ONE*, 9, e93952 (2014)
- 16) Kono K, Niimi S, Sawada R. Cyclin D2 promotes the proliferation of human mesenchymal stem cells. *J. Bone Marrow Res*, 2:1000136 (2013)
- 17) Ito-Nagahata T, Kurihara C, Hasebe M, Ishii A, Yamashita K, Iwabuchi M, Sonoda M, Fukuhara K, Sawada R, Matsuoka A, Fujiwara Y. Stilbene analogs of resveratrol improve insulin resistance through activation of AMPK. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 77:1229-1235 (2013)
- 18) Sato Y, Tsutsumi H, Sawada R, Suzuki T, Yasuda S. Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-proceed products. *国立医薬品食品衛生研究所報告*, 131:16-19 (2013)
- 19) 澤田留美 . 再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価の実際 . 再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み, シーエムシー出版 東京 (2012) pp. 28-37
- 20) 松岡厚子, 澤田留美, 加藤玲子 . 次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療分野 . 再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み, シーエムシー出版 東京 (2012) pp.38-46
- 21) Muragaki Y, Uematsu M, Iseki H, Umezu M. Analysis of benefit-risk balance in decision-making of the food and drug administration for premarket approval of therapeutic medical devices. *Advanced Biomedical Engineering*, 2:101-106 (2013)
- 22) Uematsu M, Asato K, Ichihashi T, Umezu M, Nakaoka R, Matsuoka A, Aomi S, Iimura H, Suzuki T, Muragaki Y, Iseki H. A surgical navigation system for aortic vascular surgery: a practical approach. *Conf. Proc. IEEE. Eng. Med. Biol. Soc*, 5327-5330 (2013)
- 23) 河上強志, 伊佐間和郎, 五十嵐良明 . EUにおける繊維および革製品中のアゾ

- 染料由来の特定芳香族アミン類の違反事例の特徴．国立医薬品食品衛生研究所報告， 131:66-74 (2013)
- 24) 味村真弓， 中島晴信， 吉田仁， 吉田俊明， 河上強志， 伊佐間和郎．有害物質含有家庭用品規制法で規制されている繊維製品中のトリス(2,3-ジブロモプロピル)ホスフェイト分析法の改定に向けた検討．薬学雑誌， 134:259-268 (2014)
- 25) 伊佐間和郎． ナノマテリアルのin vitro安全性評価のための基礎研究 金属酸化物ナノ粒子に対する細胞応答．薬学雑誌， 134 : 731-735 (2014)
- 26) Kawakami T, Isama K, Ikarashi Y. Analysis of isothiazolinone preservatives in polyvinyl alcohol cooling towels used in Japan. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 49:1209-1217 (2014)
- 27) 河上強志， 伊佐間和郎， 五十嵐良明． イソチアゾリノン系防腐剤による接触皮膚炎 - 家庭用品に起因する症例を中心として． Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology, 8:147-161 (2014)
- 28) 河上強志， 伊佐間和郎， 五十嵐良明． 繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の高速液体クロマトグラフィーを用いた確認試験に関する検討．国立医薬品食品衛生研究所報告， 132:57-66 (2014)
- 29) Kawakami T, Isama K, Ikarashi Y. Analysis of 19 preservatives in polyvinyl alcohol cooling towels used in Japan by high performance liquid chromatography with photo diode array detector. Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2:122 (2015)
- 30) Inoue K, Inoue Y, Ishihara K. Effects of dynamics of water molecules at hydrophilic polymer brush surfaces on protein adsorption behavior. Trans. Mater. Res. Soc. Jpn, 37:333-336 (2012)
- 31) Sakata S, Inoue Y, Ishihara K. Quantitative evaluation of interaction force between functional groups in protein and polymer brush surfaces. Langmuir, 30:2745-2751 (2014)
- 32) Sakata S, Inoue Y, Ishihara K. Nano-scale molecular interaction force measurement for analysis of protein adsorption on the surfaces. Trans. Mat. Res. Soc. Japan, 39:185-188 (2014)
- 33) Sakata S, Inoue Y, Ishihara K. Molecular Interaction Forces Generated during the Protein Adsorption to Well-defined Polymer Brush Surfaces. Langmuir, 31:3108-3114 (2015)
- 34) Hoshiba T, Nikaido M, Tanaka M. Characterization of the mechanisms of attachment of tissue-derived cell lines to blood-compatible polymers, Adv. Healthcare Mater, 3:775-784 (2014)
- 35) Tanaka M, Sato K, Kitakami E, Kobayashi S, Hoshiba T, Fukushima K. Design of biocompatible and biodegradable polymers based on

- intermediate water concept. *Polym. J.*, 47:114-121 (2014)
- 36) Ogawa T, Vandamme K, Zhang X, Naert I, Possemiers T, Chaudhari A, Sasaki K, Duyck J. Stimulation of titanium implant osseointegration through high-frequency vibration loading is enhanced when applied at high acceleration. *Calcif. Tissue Int.*, 95:467-475 (2014)
- 37) Chatterjee M, Hatori K, Duyck J, Sasaki K, Naert I, Vandamme K. High-frequency loading positively impacts titanium implant osseointegration in impaired bone. *Osteoporosis International* 26:281-290, (2014)
- 38) Shigemitsu R, Yoda N, Ogawa T, Kawata T, Gunji Y, Yamakawa Y, Ikeda K, Sasaki K. Biological-data-based finite-element stress analysis of mandibular bone with implant-supported overdenture. *Comput. Biol. Med.* 54:44-52 (2014)
- 39) Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiya T, Nakamura S, Takeda Y, Dobashi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R, Ogasawara K. NKG2D(+) IFN-(+) CD8(+) T Cells Are Responsible for Palladium Allergy. *PLoS One.* 12;9(2):e86810 (2014)
- 40) Ikai H, Odashima Y, Kanno T, Nakamura K, Shirato M, Sasaki K, Niwano Y. In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide. *PLoS One*, 25;8(11):e81316 (2013)
2. 学会発表
- 1) 新見伸吾 . 医療機器の開発から承認申請に至るまでのプロセスで産業界が留意すべき点 . 第2回 JMAC シンポジウム バイオ産業基盤としての国際標準化 (2015.1・東京)
- 2) 新見伸吾 . 次世代医療機器の評価指標作成事業の取り組み . 医療機器ガイドライン活用セミナー #5 (2014.1・東京)
- 3) 新見伸吾 . ガイドライン等の作成 次世代医療機器評価指標作成事業 . 平成 25 年度厚生科学研究費補助金/地球規模保険課題推進研究事業「医療機器規格の国際標準化を支援する体制構築に関する研究」 医療機器開発における留意点と国際標準化に関する取り組み (2014.2・東京)
- 4) 藪島由二 . 第7部:発熱性物質試験 . 説明会:医療機器の生物学的安全性評価に関連する規格等の最近の改正について (2012.5・東京)
- 5) 藪島由二 . 第7部:発熱性物質試験:各試験法の特徴と操作方法等について . 医療機器の生物学的安全性試験法講習会 (2012.9・東京)
- 6) 藪島由二, 福井千恵, 柚場俊康, 松岡厚子 . 溶血性試験用陽性対照材料の開発と性能評価 . 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11・仙台)

- 7) 藪島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 伊佐間和郎, 松岡厚子. DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発: 可塑剤溶出量と溶血性の関係について. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11・仙台)
- 8) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也. 医用高分子材料の表面近傍における水和状態のシミュレーション的評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11・仙台)
- 9) 迫田秀行, 藪島由二, 松岡厚子. スクアレンによる超高分子量ポリエチレンの劣化機構に関する検討. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11・仙台)
- 10) 河野 健, 澤田留美, 伊佐間和郎, 藪島由二, 松岡厚子. チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11・仙台)
- 11) 藪島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 伊佐間和郎, 松岡厚子. DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発: 可塑剤溶出量と溶血性の関係について. 日本薬学会第 133 年会 (2013.3・横浜)
- 12) 藪島由二, 澤田留美, 福井千恵, 松岡厚子. 間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について: 蛋白質発現の網羅的解析による検討. 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3・横浜)
- 13) 澤田留美, 藪島由二, 福井千恵, 河野 健, 松岡厚子. 間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について: 遺伝子発現の網羅的解析による検討. 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3・横浜)
- 14) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A. The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (2013.6・Boston)
- 15) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 瀬川勝智, 中野達也. 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力学的解析 (第 2 報). 第 42 回医用高分子シンポジウム (2013.7・青海)
- 16) 藪島由二, 福井千恵, 長部真博, 上野良之, 菅谷博之, 棚橋一裕, 野村祐介, 松岡厚子, 新見伸吾. ポリスルホン材料表面に吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析: PVP 含量と血液適合性の相関性について. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11・船堀)
- 17) 藪島由二, 福井千恵, 田中 賢, 野村祐介, 松岡厚子, 新見伸吾. HEMA/MEA ランダム共重合体表面に吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析: 血液適合性評価マーカの選定について. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11・船堀)
- 18) 野村祐介, 河上強志, 福井千恵, 柚場俊康, 新藤智子, 坂口圭介, 谷川隆洋, 犬飼香織, 竹ノ内美香, 伊佐間和郎, 松岡厚子, 新見伸吾, 藪

- 島由二．溶血性試験用陽性対照材料 Genapol X-080 含有 PVC シートの性能評価．第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（2013.11・船堀）
- 19) 加藤玲子，藪島由二，福井千恵，澤田留美，宮島敦子，新見伸吾．生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響（2）：タンパク質発現の網羅的解析．第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（2013.11・船堀）
- 20) 植松美幸，藪島由二，中岡竜介，新見伸吾，瀬川勝智，中野達也．血液適合性評価のための中間水同定シミュレーション．第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（2013.11・船堀）
- 21) 中岡竜介，比留間 瞳，藪島由二，新見伸吾．SAM を利用したベタイン構造模倣表面調製とその構造に関する研究．第 35 回日本バイオマテリアル学会大会（2013.11・船堀）
- 22) 中村里香，藪島由二，福井千恵，鈴木孝昌，中村亮介，安達玲子，手島玲子．加水分解小麦（グルパール 19S）に特異的に発現するペプチドの探索及び同定．第 50 回全国衛生化学技術協議会年会（2013.11・富山）
- 23) 藪島由二，福井千恵，山崎佳世，野村祐介，小園 知，熊田秀文，藤澤彩乃，井上 薫，森川朋美，市村亮平，前田 潤，高橋美和，河上強志，伊佐間和郎，柚場俊康，浜田信城，鄭 雄一，小川久美子，新見伸吾，吉田 緑．DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発：ラット精巢に及ぼす DOTP の影響評価．日本薬学会第 134 年会（2014.3・熊本）
- 24) 藪島由二，福井千恵，澤田留美，河野 健，野村祐介，新見伸吾．ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖能に対する抗酸化剤の影響評価．第 13 回日本再生医療学会総会（2014.3・京都）
- 25) Uematsu M, Haishima Y, Nakaoka R, Niimi S, Segawa K, and Nakano T. A novel evaluation methodology of materials for medical devices based on molecular dynamics simulation. The 15th International Conference on Biomedical Engineering (2013.12・Singapore)
- 26) 植松美幸，藪島由二，中岡竜介，中野達也，瀬川勝智，新見伸吾．医用材料の生体適合性評価指標開発を目的とした表面の水和上体に関する分子動力学シミュレーション．第 54 回日本生体医工学会大会（2014.5・名古屋）
- 27) 中岡竜介，藪島由二，新見伸吾．橋渡し研究及び国際標準化の行政的支援．第 53 回日本生体医工学会大会（2014.6・仙台）
- 28) 藪島由二，福井千恵，比留間瞳，野村祐介，田中 賢，新見伸吾．蛋白質吸着挙動に基づく血液適合性評価マーカーの検証に関する研究．第 36 回日本バイオマテリアル学会大会（2014.11・船堀）
- 29) 藪島由二，福井千恵，山崎佳世，野村祐介，小園 知，熊田秀文，藤澤彩乃，井上 薫，森川朋美，市村亮平，前田 潤，高橋美和，河上強志，伊佐間和郎，柚場俊康，鄭雄一，小川久美子，新見伸吾，吉田 緑．新規血液バッグ用代替可塑剤 DOTP のラット亜慢性毒性試験．第 36 回日本バイオ

- マテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 30) 藪島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 向井智和, 野村祐介, 伊佐間和郎, 新見伸吾. 新規血液バッグ素材 DOTH/DINCH 配合 PVC シートの性能評価. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 31) 野村祐介, 福井千恵, 柚場俊康, 新藤智子, 坂口圭介, 谷川隆洋, 杉山知子, 竹ノ内美香, 新見伸吾, 藪島由二. 簡易溶血性試験法の性能評価と公定法との比較検証. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 32) 野村祐介, 福井千恵, 戸井田瞳, 新見伸吾, 宮川伸, 金玲, 中村義一, 藪島由二. RNA アプタマーを用いた新規医用材料の開発. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 33) 加藤玲子, 藪島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 宮島敦子, 新見伸吾. ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 34) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 中野達也, 瀬川勝智, 新見伸吾. 分子動力的シミュレーションによる PMEA 分子に存在する水の挙動解析. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 35) 迫田秀行, 柚場俊康, 向井智和, 新見伸吾, 藪島由二. 新規血液バッグ素材 DOTH/DINCH 配合 PVC シートの力学特性. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 36) 藪島由二. 医療機器・再生医療等製品分野におけるエンドトキシンの諸問題. 第 30 回 GMP とバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム (2015.3・品川)
- 37) Olsen DS, Lee M, Turley A, Sasaki S, Yamasaki K, Fukui C, Nomura Y, Kato R, Yuba T, Sakaguchi K, Haishima Y. Extractable positive control for in vitro skin irritation testing of medical devices. 54th Annual Meeting and ToxExpo (2015,3・San Diego).
- 38) Miyajima-Tabata A, Sakai K, Kato R, Matsuoka A. Studies on cytotoxicity and genotoxicity in CHL cells cultured on MPC polymers. Eurotox 2012 (2012. 6・Stockholm)
- 39) Kubo T, Hori T, Kuroda Y, Hojyo M, Miyajima A, Sunouchi M, Anne Corlu A, Morel F, Ozawa S, Sekino Y, Ishida S. Comparative analyses of genomic DNA methylation and gene expression in hepatic cells. 第 27 回日本薬物動態学会年会 (2012.11・東京)
- 40) 宮島敦子, 加藤玲子, 酒井恵子, 松岡厚子. 高分子医用材料上で培養した細胞の細胞毒性および遺伝毒性. 2012 バイオマテリアル学会 (2012.11・仙台)
- 41) Miyajima-Tabata A, Kato R, Sakai K, Matsuoka A. Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (2013.9・Interlaken)
- 42) 宮島敦子, 加藤玲子, 小森谷薫, 新見伸吾. 生体適合性高分子医用材料

- 上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答．第35回日本バイオマテリアル学会大会（2013.11・船堀）
- 43) 加藤玲子，佐藤正人，岡田恵里，阿久津英憲，小久保舞美，河毛知子，宮島敦子，梅澤明弘，持田譲治，新見伸吾．多指症由来軟骨細胞の同種T細胞におよぼす影響．第27回日本軟骨代謝学会（2014.2・京都）
- 44) Miyajima-Tabata A, Kato R, Komoriya K, Niimi S. Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials. Eurotox 2014 (2014.9・Edinburgh)
- 45) 宮島敦子，小森谷薫，田中賢，比留間瞳，加藤玲子，新見伸吾．血液適合性試験におけるHEMA/MEAランダム共重合体材料に対する蛋白質マーカーの挙動について．第36回日本バイオマテリアル学会大会（2014.11・船堀）
- 46) Miyajima-Tabata A, Kawakami T, Komoriya K, Kato R, Niimi S, Isama K. Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells. The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3・San Diego)
- 47) 加藤玲子，佐藤正人，小久保舞美，河毛知子，宮島敦子，持田譲治，松岡厚子．積層化軟骨細胞シート上の同種T細胞におよぼす影響．第50回日本人工臓器学会大会（2012.11・福岡）
- 48) 宮島敦子，河上強志，加藤玲子，酒井恵子，小森谷薫，新見伸吾，伊佐間和郎．酸化金属ナノマテリアルのA549細胞に対する細胞毒性および遺伝毒性．日本薬学会第134年会（2014.3・熊本）
- 49) 河上強志，宮島敦子，小森谷薫，加藤玲子，伊佐間和郎．NiOナノ粒子の細胞毒性に及ぼす懸濁液中の二次粒子径の影響．日本薬学会第134年会（熊本，2014.3）
- 50) 宮島敦子，河上強志，小森谷薫，加藤玲子，新見伸吾，伊佐間和郎．酸化金属ナノマテリアルに対するTHP-1細胞の細胞応答．第41回日本毒性学会（2014.7・神戸）
- 51) 加藤玲子，佐藤正人，岡田恵里，阿久津英憲，小久保舞美，河毛知子，宮島敦子，梅澤明弘，持田譲治，新見伸吾．多指症組織由来細胞の免疫制御能の解析．第29回日本整形外科学会基礎学術集会（2014.10・鹿児島）
- 52) 河野健，新見伸吾，澤田留美．間葉系幹細胞における細胞分化とLINE-1の発現について．第14回日本再生医療学会総会（2015.3・横浜）
- 53) 高田のぞみ，河野健，安田智，澤田留美，新見伸吾，松山晃文，佐藤陽治．細胞増殖特性を利用した不死化細胞検出試験法の性能評価．第14回日本再生医療学会総会（2015.3・横浜）
- 54) 佐々木寛人，高橋厚妃，蟹江慧，澤田留美，本多裕之，清田泰次郎，加藤竜司．骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化モニタリング．第14回日本再生医療学会総会（2015.3・横浜）
- 55) 澤田留美，河野健，比留間瞳，加藤玲子，新見伸吾．生体親和性高

- 分子材料によるヒト単球細胞の機能の制御について 遺伝子発現の網羅的解析による検討．第36回日本バイオマテリアル学会大会（2014.11・船橋）
- 56) Kono K, Niimi S, Sawada R. Analysis of Line1 expression in human mesenchymal stem cells, 12th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2014.6・Vancouver)
- 57) Sasaki H, Okada N, Kanie K, Kiyota Y, Honda H, Sawada R, Kato R. Image-based profiling of mesenchymal stem cells using non-label images. TERMIS-EU 2014 (2014.6・Genova)
- 58) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾. 間葉系幹細胞の増殖培養過程における品質評価のための遺伝子発現解析．第13回日本再生医療学会総会（2014.3・京都）
- 59) 河野 健, 新見伸吾, 澤田留美. 間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究．第13回日本再生医療学会総会（2014.3・京都）
- 60) 佐々木寛人, 蟹江慧, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司. 間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化の細胞形態と発現プロファイリングとの相関解析．第13回日本再生医療学会総会（2014.3・京都）
- 61) 佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 竹内一郎, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司. 細胞画像情報解析による間葉系幹細胞分化能の品質プロファイリング．第13回日本再生医療学会総会（2014.3・京都）
- 62) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾, 間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究．第36回日本分子生物学会年会(2013.12・神戸)
- 63) Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Matsuyama A, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of in vivo tumorigenicity test using severe immunodeficient NOG mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products, World Stem Cell Summit 2013 (2013.12・San Diego)
- 64) Kono K, Sawada R, Matsuoka A. Overexpression of cyclin D2 promotes cell proliferation of human mesenchymal stem cells. 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6・Boston)
- 65) Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Kuroda T, Sawada R, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Validation of in vivo tumorigenicity test for the process control of cell/tissue-engineered products using severe immunodeficient NOG mice. 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6・Boston)
- 66) 澤田留美. 再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価法の確立を目指して．日本バイオマテリアル学会2013年度第1回セミナー（2013.5・東京）
- 67) 松岡 厚子, 澤田 留美, 加藤 玲

- 子, 河野 健. 次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療分野審査 WG 活動報告. 日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5・東京)
- 68) 河野 健, 澤田留美, 松岡厚子. 細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価. 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3・京都)
- 69) 草川森士, 町田一彦, 安田智, 黒田拓也, 澤田留美, 伊藤守, 堤秀樹, 川真田伸, 佐藤陽治. 細胞・組織加工製品の製造工程管理法としての NOG マウス造腫瘍性試験系のバリデーション. 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3・京都)
- 70) 澤田留美, 河野 健, 松岡厚子. 細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価 がん化の指標探索のための遺伝子発現解析. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11・仙台)
- 71) Sasaki H, Matsuoka F, Takahashi A, Takeuchi I, Sawada R, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Morphology-based prediction of differentiation potential of mesenchymal stem cells. 3rd TERMIS World Congress2012 (2012.9・Vienna)
- 72) 澤田留美, 藪島由二, 福井千恵, 河野 健, 松岡厚子. 間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(2) 遺伝子発現の網羅的解析による検討. 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6・横浜)
- 73) 藪島由二, 福井千恵, 澤田留美, 松岡厚子. 間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(1) 蛋白質の網羅的発現解析による検討. 第 11 回日本再生医療学会 (2012.6・横浜)
- 74) 佐々木寛人, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司. 骨髄由来間葉系幹細胞の画像情報解析による劣化度評価. 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6・横浜)
- 75) 佐々木寛人, 高橋厚妃, 坪井泰樹, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司. 間葉系幹細胞画像の情報解析による細胞状態分類法の有効性. 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6・横浜)
- 76) Sasaki H, Matsuoka F, Takeuchi I, Sawada R, Honda H, Kato R. Morphology-based cell quality assessment of differentiation potential of mesenchymal stem cells. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2012.6・Yokohama)
- 77) Uematsu M, Haishima Y, Nakaoka R, Nakano T, Segawa K, Niimi S. Developing a Biocompatibility Evaluation System Utilizing Molecular Dynamics Simulation of Hydration on Surface of Biomaterials. The 54th Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering (2015.5・Nagoya accepted)
- 78) 植松美幸, 高橋泰浩, 梅津光生, 中岡竜介, 新見伸吾, 青見茂之, 飯村浩, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋, 岩崎清隆. ユーザビリティを考慮した大血管ナビゲーションの設計開発.

- 第 23 回日本コンピュータ外科学会大会 (2014.11・大阪)
- 79) 植松美幸, 此枝央人, 櫻井裕之, 正宗賢, 中岡竜介, 新見伸吾, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋. 皮弁挙上時の血管走行把握を支援するナビゲーション誤差検討. 第 22 回日本コンピュータ外科学会大会 (2013.8・東京)
- 80) 植松美幸, 薮島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也. 医用高分子材料の生体適合性評価指標開発に向けた分子動力的シミュレーション. 第 50 回日本人工臓器学会大会 (2012.11・福岡)
- 81) 岸本眞治, 村垣善浩, 岡本淳, 吉光喜太郎, 鈴木孝司, 伊関洋, 吉澤晋, 梅村晋一郎, 植松美幸, 松岡厚子, 阿部信隆, 仲本秀和, 鍋木正志, 川畑健一, 石井宏志. 先端医療機器開発における国際標準化の役割. 第 33 回日本レーザー医学会総会 (2012.10・大阪)
- 82) 安里権也, 植松美幸, 市橋琢弥, 梅津光生, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 飯村浩, 青見茂之, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋. 解剖学的特徴点計測における誤差評価についての実験的検討. 第 21 回日本コンピュータ外科学会 (2012.10・徳島)
- 83) 植松美幸, 市橋琢弥, 安里権也, 梅津光生, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 飯村浩, 吉見茂之, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋. AAA Navigator の開発と臨床的評価の実際. 第 21 回コンピュータ外科学会 (2012.10・徳島)
- 84) 市橋琢弥, 植松美幸, 安里権也, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 東隆, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋. 弓部大動脈瘤用ステントグラフト留置過程のデータに基づく可視化に向けた初期的検討. 第 21 回日本コンピュータ外科学会大会 (2012.10・徳島)
- 85) 此枝央人, 櫻井裕之, 植松美幸, 佐藤生馬, 上内洋輝, 正宗賢. 穿通枝皮弁 (DIEP flap) 挙上時の血管走行可視化の試み. 第 17 回日本形成外科手術手技学会 (2012.7・東京)
- 86) 植松美幸, 薮島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 中野達也, 瀬川勝智. 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析(第 1 報). 第 41 回医用高分子シンポジウム (2012.6・東京)
- 87) Isama K, Kawakami T, Matsuoka A. Surface characteristics and apatite-forming ability of calcium-incorporating titanium. 25th European Conference on Biomaterials (2013.9・Madrid)
- 88) 伊佐間和郎, 河上強志, 松岡厚子. カルシウム導入したチタンの表面特性とアパタイト形成能. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11・船堀)
- 89) 薮島由二, 福井千恵, 山崎佳世, 野村祐介, 小園知, 熊田秀文, 藤澤彩乃, 井上薫, 森川朋美, 市村亮平, 前田潤, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 浜田信城, 鄭雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田緑. DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発 - ラット精巢に及ぼす DOTP の影響評価 - . 本薬学会第 134 年会 (2014.3・熊本)
- 90) Isama K, Kawakami T, Miyajima A.

- Characteristics and cytotoxic effects of nanoparticles when coexisting with metal salts. 50th Congress of the European Societies of Toxicology (2014.9・Edinburgh)
- 91) 伊佐間和郎, 河上強志, 新見伸吾. 血液適合性材料に吸着するタンパク質の動力学的解析. 第36回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 92) 伊佐間和郎, 河上強志, 五十嵐良明. 亜リン酸エステル系酸化防止剤の細胞毒性及び皮膚感作性. 日本薬学会第135年会 (2015.3・神戸)
- 93) 配島由二, 福井千恵, 野村祐介, 藤澤彩乃, 山崎佳世, 熊田秀文, 井上薫, 森川朋美, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 宮崎謙一, 鄭雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田緑. PVC製血液バッグに適用可能な新規可塑剤 NJC-NP の毒性評価. 日本薬学会第135年会 (2015.3・神戸)
- 94) Sakata S, Inoue Y, Ishihara K. Interaction forces related to protein adsorption on polymer brush surfaces. The Society For Biomaterials 2013 Annual Meeting and Exposition: Biomaterials Revolution Boston (2013.4・Boston)
- 95) 坂田翔, 井上祐貴, 石原一彦. 種々の力が作用するポリマーブラシ表面へのタンパク質の吸着挙動. 第62回高分子学会年次大会 (2013.5・京都)
- 96) 坂田翔, 井上祐貴, 石原一彦. タンパク質非吸着を実現する表面相互作用力の定量解析. 第62回高分子討論会 (2013.9・金沢)
- 97) Sakata S, Inoue Y, Ishihara K. Nano-force analysis for understanding protein-materials interactions. 2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013 (2013.10・Tokyo)
- 98) 井上祐貴, 坂田翔, 石原一彦. タンパク質吸着の AFM ナノフォース解析. 第35回バイオマテリアル学会大会 (2013.11・船堀)
- 99) 坂田翔, 井上祐貴, 石原一彦. タンパク質吸着の理解を目指したナノスケールの相互作用力解析手法の確立. 第23回日本 MRS 年次大会 (2013.12・横浜)
- 100) Sakata S, Inoue Y, Ishihara K. Surface interaction forces governing protein adsorption analyzed by direct force measurement. The Society For Biomaterials 2014 Annual Meeting and Exposition: Pioneering the Future of Biomaterials (2014.4・Denver)
- 101) 坂田翔, 井上祐貴, 石原一彦. 表面で観測される力の解析に基づくタンパク質非吸着表面の創製. 第63回高分子学会年次大会 (2014.5・名古屋)
- 102) 坂田翔, 井上祐貴, 石原一彦. タンパク質吸着における分子間相互作用力の役割. 第43回医用高分子シンポジウム (2014.7・東京)
- 103) 坂田翔, 井上祐貴, 石原一彦. ポリマー表面における分子間相互作用力の精密解析とタンパク質吸着プロセスの理解. 第63回高分子討論会 長崎 (2014.9・長崎)
- 104) 坂田翔, 井上祐貴, 石原一彦.

- 種々の分子間相互作用力に基づくタンパク質吸着プロセスの理解．第36回バイオマテリアル学会大会（2014.1・船堀）
- 105) 井上祐貴，石原一彦．マテリアル表面近傍の水和構造がタンパク質との相互作用に与える影響．第36回バイオマテリアル学会大会（2014.11・船堀）
- 106) Sakata S, Inoue Y, Ishihara K. Analysis of protein adsorption force generated at polymer surfaces for designing non-biofouling surfaces. The 10th International Polymer Conference (2014.12, Tsukuba)
- 107) Ishihara K, Sakata S, Inoue Y. Nanoforce measurements for understanding protein adsorption at the biocompatible surface. 8th International Symposium on Nanomedicine (2014.12, Matsuyama)
- 108) 坂田翔，井上祐貴，石原一彦．タンパク質吸着プロセスの理解を目指した分子間相互作用力の解析．第24回日本MRS年次大会（2014.12・横浜）
- 109) 大澤康平，小林慎吾，田中賢．側鎖間隔を制御した新規アミド基導入ポリマーの合成．第63回高分子学会年次大会（2014.5・名古屋）
- 110) 戸来奎介，福田考作，小林慎吾，田中賢．側鎖-側鎖間の炭素数を制御した新規PMEA類似体の合成とその抗血栓性評価．第63回高分子学会年次大会（2014.5・名古屋）
- 111) 福田考作，戸来奎介，小林慎吾，田中賢．regio選択的な開環メタセシス重合による定序性ポリ(3,4-ジメトキシシクロオクテン)の合成とその抗血栓性評価．第63回高分子学会年次大会（2014.5・名古屋）
- 112) 片岡真依子，岩田幸久，小林慎吾，田中賢．Regio選択的な開環メタセシス重合を用いた新規PTHFA類似体の合成とその血液適合性評価．第63回高分子学会年次大会（2014.5・名古屋）
- 113) Tsai M-Y, Inoue Y, Ota T, Fukushima K, Tanaka M. DSC study of hydrated aliphatic carbonyl polymers. 第63回高分子学会年次大会（2014.5・名古屋）
- 114) 井上裕人，佐藤千香子，佐々木彩乃，福島和樹，田中賢．抗血栓性脂肪族ポリカーボネートの細胞接着性と生分解性．第63回高分子学会年次大会（2014.5・名古屋）
- 115) 太田貴之，蔡孟諭，福島和樹，田中賢．エーテル置換基を有する環状カルボニル化合物の合成と開環重合．化学系学協会東北大会（2014.9・米沢）
- 116) 片岡真依子，岩田幸久，小林慎吾，田中賢．テトラヒドロフラン環を側鎖に有する定序性ポリマーの合成．化学系学協会東北大会（2014.9・米沢）
- 117) 大澤康平，小林慎吾，田中賢．側鎖間隔を制御した新規アミド基導入ポリマーの合成とその水和構造解析．化学系学協会東北大会（2014.9・米沢）
- 118) 泉井美幸，岩田幸久，小林慎吾，田中賢．Poly(methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価．化学系学協会東北大会（2014.9・米沢）
- 119) 甘三奇，小林慎吾，田中賢．水酸基を有するポリ(メタ)アクリレート誘導体の合成とその血液適合性評価．化学系学協会東北大会（2014.9・米沢）

- 120) 福島和樹, 太田貴之, 高岡駿矢, 佐藤駿介, 松崎広大, 岸昂平, 田中賢. 有機分子触媒を用いた機能性バイオマテリアルの精密合成. 第 63 回高分子討論会 (2014. 9・長崎)
- 121) 福島和樹, 蔡孟諭, 太田貴之, 井上裕人, 岸昂平, 田中賢. 脂肪族エステル系ポリマーの抗血栓性と水和に及ぼす構造因子の解析. 第 63 回高分子討論会 (2014.9・長崎)
- 122) 干場隆志, 佐藤一博, 大類寿彦, 丸山寛花, 遠藤千穂, 田中賢. 中間水が異なる高分子による細胞接着の制御とその応用. 第 63 回高分子討論会 (2014.9・長崎)
- 123) 小林慎吾, 福田考作, 戸来奎介, 北上恵理香, 片岡真依子, 大澤康平, 田中賢. regioselective ROMP 法を用いた定序性高分子の合成とバイオマテリアルへの応用. 第 63 回高分子討論会 (2014.9・長崎)
- 124) 大澤康平, 小林慎吾, 田中賢. Regio 選択的な開環メタセシス重合による側鎖間隔を制御した新規アミド基導入ポリマーの合成とその水和構造解析. 第 63 回高分子討論会 (2014.9・長崎)
- 125) Xue S, Kobayashi S, Tanaka M, Furusawa H. Measurements of hydration amount and viscoelasticity of biocompatible polymers using quartz-crystal microbalance with dissipation technique. SmsSys2014 (2014.10・米沢)
- 126) 大澤康平, 小林慎吾, 田中賢. Synthesis of polymers having amide side-chains and analysis of hydration structure. SmsSys2014 (2014.10・米沢)
- 127) 岸 昂平, 井上裕人, 佐々木彩乃, 佐藤千香子, 田中賢, 福島和樹. Polymeric Degradable Antimicrobials with Enhanced Blood Compatibility. SmsSys2014 (2014.10・米沢)
- 128) 田中賢, 佐藤一博, 北上恵理香, 小林慎吾, 干場隆志, 福島和樹. 中間水コンセプトによる生体親和性高分子の設計と診断・治療デバイスへの応用. 第 23 回ポリマー材料フォーラム (2014.11・奈良)
- 129) 泉井美幸, 岩田幸久, 小林慎吾, 田中賢. Poly(methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価. 第 25 回バイオマテリアル若手研究会 (2014.11・八王子)
- 130) 片岡真依子, 小林慎吾, 田中賢. テトラヒドロフラン環を側鎖に有する定序性高分子の合成と抗血栓性評価. 2014 高分子学会東北支部会 (2014.11・郡山)
- 131) 福島和樹. 機能性脂肪族ポリカーボネートを用いたバイオメディカル材料の新展開. 2014 高分子学会東北支部会 (2014.11・郡山)
- 132) 佐藤一博, 小林慎吾, 綿引省吾, 及川昌彦, 干場隆志, 田中賢. エチレングリコール鎖に注目した Poly(2-methoxyethyl acrylate)類似体の高分子-水相互作用の解析と抗血栓性評価. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 133) 片岡真依子, 小林慎吾, 田中賢. テトラヒドロフラン環を側鎖に有する定

- 序性高分子の合成と抗血栓性評価． 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 134) 福田考作, 戸来奎介, 小林慎吾, 田中賢． ポリ(3,4-ジメトキシシクロオクテン)の合成とその抗血栓性評価． 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 136) 泉井美幸, 岩田幸久, 小林慎吾, 田中賢． Poly(methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価． 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 137) 井上裕人, 佐藤千香子, 佐々木彩乃, 福島和樹, 田中賢． 抗血栓性を示す生分解性ポリカーボネートを含むポリウレタンの合成と特性評価． 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 138) 太田貴之, 蔡孟諭, 井上裕人, 福島和樹, 田中賢． 生分解性ポリマーの水和に関する構造因子の解析と抗血栓性への効果． 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 139) 甘三奇, 小林慎吾, 田中賢． Water structure of blood compatible poly[hydroxyalkyl(meth)acrylate]s. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11・船堀)
- 140) 戸来奎介, 福田考作, 小林慎吾, 田中賢． Synthesis and blood-compatibility evaluation of novel PMEA analogs having precisely placed side-chain branches. 第 10 回 IPC2014 (2014.12・つくば)
- 141) 片岡真依子, 小林慎吾, 田中賢． Synthesis of novel polymers having precisely placed tetrahydrofurfuryl side-chain branches via regioselective ring-opening metathesis polymerization and their blood compatibility evaluation. 第 10 回 IPC2014 (2014.2・つくば)
- 142) 福田考作, 小林慎吾, 田中賢． Synthesis of sequence- and geometry-specific poly(3,4-dimethoxycyclooctene)s and their antithrombotic evaluation. 第 10 回 IPC2014 (2014.12・つくば)
- 143) 佐藤一博, 小林慎吾, 綿引省吾, 及川昌彦, 干場隆志, 田中賢． The relationship between water structure and blood compatibility in poly(2poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) analogues. 第 10 回 IPC2014 (2014.12・つくば)
- 144) 福島和樹, 井上裕人, 岸昂平, 太田貴之, Meng-Yu Tsai, 佐藤駿祐, 松崎 広 大． Functional degradable biomaterials based on organocatalysis and substituted cyclic carbonates. 第 10 回 IPC2014 (2014.12・つくば)
- 145) 小林慎吾, 福田考作, 戸来奎介, 片岡真依子, 大澤康平, 田中賢． Synthesis of sequence-specific polymers via regioselective ROMP and biomaterial applications. 第 10 回 IPC2014 (2014.12・つくば)
- 146) 甘三奇, 小林慎吾, 田中賢． Synthesis and anti-thrombotic evaluation of novel PHEMA analogs having different side-chain structures. 第 10

回 IPC2014 (2014.12・つくば)
147) 大澤康平, 小林慎吾, 田中賢 .
Synthesis of novel regioregular
polymers having amide side-chains via
regioselective ring-opening
metathesis polymerization and their
biocompatibility evaluation. 第 10 回
IPC2014 (2014.12・つくば)
148) 大竹義雄, 高橋 哲, 山内健介,
小山重人, 佐々木啓一 . 当院歯科イン
プラントセンターにおける 1 年間の臨
床統計 . 第 34 回日本口腔インプラント

学会 東北・北海道支部学会
(2014.11・山形)
149) Ogawa T, Shibamoto A, Zhang X,
Naert I, Sasaki K, Duyck J, Effect of
low-magnitude and high-frequency
loading on peri-implant bone healing
and osseointegration in rats.
China-Japan-Korea Dental Science
Symposium 2014 (2014.11・Dalian)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2013-104082 (平成 25 年 5 月 16 日)「血液バッグ」. 発明者: 藪島由二, 河上強志、福井千恵、田上昭人、伊佐間和郎、松岡厚子、柚場俊康

特願 2015-17514 (平成 27 年 1 月 30 日)「医療用バッグ」. 発明者: 藪島由二, 福井千恵、河上強志、迫田秀行、野村祐介、伊佐間和郎、新見伸吾、柚場俊康、向井智和、清麻里子

研究協力者

- 野村祐介 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 研究員
- 中岡竜介 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 埋植医療機器評価室長
- 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第四室長
- 河野健 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 主任研究官
- 中野達也 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 第四室長
- 瀬川勝智 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 主任研究官
- 福井千恵 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
- 比留間瞳 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
- 小森谷薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
- 柚場俊康 川澄化学工業株式会社
- 新家光雄 東北大学金属材料研究所 研究所長・教授、日本金属学会 理事
- 埴隆夫 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 研究所長・教授、
日本歯科理工学会 理事長
- 渡邊文彦 日本歯科大学新潟生命歯学部 教授、日本口腔インプラント学会 理事長
- 古谷野潔 九州大学歯学研究院 教授、日本口腔インプラント学会 理事・学術委員長、
日本補綴歯科学会 理事・前理事長
- 矢谷博文 大阪大学大学院歯学研究科 教授、日本補綴歯科学会 理事長
- 窪木拓男 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 歯学部長・教授、
日本補綴歯科学会 理事・学術委員長
- 長島利夫 上智大学理工学部 教授
- 東藤貢 九州大学応用力学研究所 准教授
- 金高弘恭 東北大学大学院歯学研究科 准教授、PMDA医療機器審査第二部

【本文中で使用された略号】

ATRP: Atom transfer radical polymerization
MPC: 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
CBMA: *N*-methacryloyloxyethyl *N,N*-dimethyl ammonium-*N*-methyl carboxylate
SBMA: [2-(methacryloyloxy) ethyl] dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide
mOEGMA: Oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate
TMAEMA: 2-trimethylammoniummethyl methacrylate
BMA: *n*-butyl methacrylate
DLC: Diamond-like carbon
PEOEVE: Poly (2-ethoxy-ethyl vinyl ether)
PTHFVE: Poly (tetrahydrofurfuryl vinyl ether)
PMe3A: Poly [2-{2-(2-methoxy-ethoxy) ethoxy} ethyl acrylate-co-butyl acrylate]
Alb: albumin
Lys: Lysozyme (ニワトリ卵白由来)
AFM: Atomic Force Microscopy
PMEA : Poly(2-methoxyethyl acrylate)
PHEMA : Poly(hydroxyl-ethyl methacrylate)
MEA : 2-methoxyethyl acrylate
HEMA : Hydroxyl-ethyl methacrylate)
FIB: Fibrinogen
FINC: Fibronectin
VTNC: Vitronectin
PMEM: Poly(2-methoxyethyl metacrylate)
QCM: Quartz Crystal Microbalance
QCM-D: Quartz Crystal Microbalance with dissipation monitoring system
PP: Polypropylene
PC: Polycarbonate
PET: Polyethylene terephthalate
-TG: -Thromboglobulin
TAT: Thrombin-Antithrombin Complex
ROMP: Ring opening metathesis polymerization
DSC: Differential scanning calorimetry
HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells
IL-8: Interleukin 8
IPA: Ingenuity pathways analysis

TCPS: Tissue culture-treated polystyrene

EMT: Epithelial-mesenchymal transition

hMSC: Human mesenchymal stem cells

PBT: Poly butylene terephthalate

PA: Polyamide

総合分担研究報告書

平成 24-26 年度厚生科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合）研究事業
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」
（H24-医薬-指定-018）

分担研究課題名

プロテオミクス解析を利用した医用材料の生体適合性・機能評価に関する研究

分担研究者 齋島 由二 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

協力研究者

田中 賢	山形大学	比留間 瞳	国立医薬品食品衛生研究所
中岡 竜介	国立医薬品食品衛生研究所	柚場 俊康	川澄化学工業株式会社
野村 祐介	国立医薬品食品衛生研究所	棚橋 一裕	東レ先端材料研究所
福井 千恵	国立医薬品食品衛生研究所		

研究要旨

本研究では、医用材料の血液適合性を蛋白質吸着特性から評価する新たな手法の開発を目指し、血液適合性の異なる種々の材料を対象としたプロテオミクス解析により、血液適合性評価マーカー蛋白質の探索及び検証実験を行った。

平成 24 年度は、血液適合性の異なる 23 種類の材料（チタン材料 6 種類、PVP/PSF 材料 6 種類、一般プラスチック 6 種類、MEA/HEMA 系材料 5 種類）に吸着する血漿蛋白質の網羅的プロテオミクス解析を行い、血液適合性評価マーカー候補として、FA7、FA9、FA12、C1r、C1s、C3、C5、FHR1、FIBB、FINC、VTNC、GPX3 及び PLD5 を選定した。平成 25 年度は、これらの候補蛋白質の有用性を標的プロテオミクス解析により検証し、FA7、FA9、C1s、C1r、C3、FINC、VTNC 及び FHR1 が血液適合性評価マーカーとして利用できる可能性を見出した。平成 26 年度は、検証データを収集する一環として、DLC 系ステント材料の血液適合性を網羅的プロテオミクス解析に評価した結果、過去に報告された invitro 試験、動物実験及び臨床評価と一致する成績が得られた。また、新たに合成された生体適合高分子である PTHFVE、PEOEVE 及び PMe3A の血液適合性も蛋白質吸着特性から予測・評価できることが示唆される等、本研究において得られた成績は、我々が選定した血液適合性評価マーカーの有用性を検証する上で非常に有益な情報となった。

本研究により、医用材料の血液適合性は、その表面に吸着する血漿蛋白質の種類及び量から予測・評価できることが示唆された。今後、標的プロテオミクスにおける標準誤差が統計学的に 95%信頼区間に入るまで繰り返し測定（n=10）を行い、我々が選定した血液適合性評価マーカーの有用性を更に検証する。また、本評価法を公定法として広めるため、ELISA 等の簡易な測定系を利用した試験法の開発を目指す。

A . 研究目的

医療機器及び医用材料の生体適合性は、種々の溶出物や残留物質等の毒性、微生物汚染に由来する感染因子のほか、材料表面の物理化学的特性に大きく影響される。これは、医用材料が細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その界面（バイオインターフェース）で起

こる分子間相互作用を介して機能を発揮することに由来する。医用材料を生体内に埋植すると、材料表面に水やイオンが速やかに吸着し、次いで生体蛋白質の吸着が起こる。細胞は材料表面上で構造変化した吸着蛋白質を介して材料に接着することにより、最終的な生体反応を誘導する。すなわち、医用材料と細胞は吸着蛋白質層

を介して相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与すると考えられている。

医用材料の蛋白質吸着については、血栓形成や細胞接着等に着眼した研究が行われてきたが、材料に吸着する蛋白質の種類を網羅的に解析し、その吸着パターンから材料の機能や生体適合性を評価する研究は現在までに実施されていない。材料表面への蛋白質吸着挙動から細胞や組織に対する影響を評価する手法は材料プロテオームと呼ぶべき新しい分野のプロテオミクスとなる。プロテオミクスの技術は培養細胞や埋植材料周辺域における組織の性状変化の解析等にも利用できる。網羅的解析により特定のバイオマーカを決定することができれば、標的プロテオミクスを利用した同マーカの微量定量が可能となり、材料の機能や生体適合性、細胞又は組織の状態等を判断するための有益な評価手法となり得る。

インプラント型の循環器系医療機器では、長期間に渡って血液凝固や血栓形成等を起こさないことが要求される。血液適合性の評価としては、血栓形成、血液凝固、血小板、溶血性及び補体系の5つの試験項目が存在するが、未だ国際的に十分整合されていない状況にある。そこで我々は、バイオインターフェースの特性に着目した医用材料の新規評価方法を開発することを目的として、各種材料表面への蛋白質吸着挙動と血液適合性及び骨親和性の相関性について検討してきた。対照となる一般プラスチック材料(C-PET, CTA, PS, PTFE, PSF, UHMWPE)及び種々の化学処理を施したチタン材料への血漿蛋白質の吸着挙動解析は過去に実施した一連の試験において終了している。

本研究では、材料表面への蛋白質吸着特性と血液適合性の相関評価に係る基礎データを更に集積し、新たな試験法の提案に繋げるため、血液適合性の異なる種々の材料を対象としたプロテオミクス解析により、血液適合性評価マーカ

蛋白質の探索及び検証実験を行った。

B. 研究方法

(1)材料

高分子材料として、PVP含量の異なるPSFシート(PVP含量:0, 1, 5, 9, 20, 33 wt%)、PHEMA、PMEA、PTHFVE、PEOEVE、PMe3A及びMEA/HEMAランダム共重合体(MEA/HEMA=25/75, 50/50, 75/25)を使用した。

血管ステント用金属材料としては、SUS、SUS/DLC、SUS/Si-DLC、SUS/30%F/DLC、Co-Cr及びNi-Tiを使用した。Ni-Tiは円筒状、Co-Crは半円筒状、その他の材料はプレート状であり、いずれの材料も表面粗さを統一した。

(3)PCシートの作製

メタノールで洗浄したPCシート(33 mm、厚さ0.1 mm)をPTFEメンブランフィルタを介してスピニコータに固定し、4000 rpm回転下、PHEMA、PMEA、PTHFVE、PEOEVE、PMe3A又はMEA/HEMAランダム共重合体のメタノール溶液(1 w/v%、100 µL)をPCシートの中央に滴下し、10秒間保持した。乾燥後、同様の操作を再度繰り返すことにより、表面を均一にコーティングした。片面のコーティングが終了した後、もう片面を同様に処理して両面コートPCシートを作製した。

(4)表面解析

液滴法及び水中気泡法による静的接触角はERMA接触角測定器G-1-1000を用いて測定した。XPS解析は、島津製ESCA3200を用いて行った。SEM画像は試料をAu被覆した後、JEOL JSM-5800LV走査型電子顕微鏡を用いて取得した。

(5)血漿蛋白質の吸着と回収

各種材料をそれぞれ個別に15 cmガラス製シャーレ中で20 mLのヘパリン加ヒト血漿に37℃で1時間緩やかに振とう/浸漬した後、同血

漿を除去した。次いで、同材料を氷冷した 1 mM PBS により 5 回洗浄した後、20 ml の細胞溶解液を添加し、室温で 60 分間、緩やかに振とうした。同溶液を Corning 社製 Spin-X UF (Cut Off = 5 kDa) により濃縮し、冷メタノール沈殿法により蛋白質画分を回収し、細胞溶解液に再溶解した後、アプロサイエンス社製 XL-Bradford により蛋白質量を測定した。得られた蛋白質は試験に供するまで凍結保存した。対照試料として、尿素変性ヒト血漿蛋白質を同様の方法により調製した。

(6) ペプチドの調製

常法に従って還元及びアルキル化した蛋白質試料を含む細胞溶解液に 50 mM NH_4HCO_3 、プロメガ社製 Protease Max Surfactant 及び Trypsin Gold を添加し、37 °C で 4 時間インキュベーションした後、10% TFA を加え、室温で 5 分間放置して反応を停止させた。得られたペプチドはバリアン社製 OMIX Tip (C18) を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant) に供して乾燥させた後、0.1% TFA 含有 2% アセトニトリルを加えて溶解し、LC-MS/MS 分析に供するまで 4 °C で保存した。

TMT 標識ペプチドは、Thermo Scientific 社製 TMT 6plex 試薬を用いて常法に従って調製した。

(7) 定量用標準品の化学合成

13 種類の血液適合性評価用マーカ候補蛋白質を定量するため、各材料表面に吸着した蛋白質の網羅的解析において共通且つ高感度で検出されたペプチドを定量用プローブとして選択し、化学合成した。内部標準用ペプチドは安定同位体標識した任意のアミノ酸を 1 残基導入して調製した。

(8) LC-MS/MS 分析

質量分析計として、Thermo Scientific 社製 LTQ/Orbitrap (非標識ペプチド/網羅的解析) 及び Q-Exactive (TMT 標識ペプチド/網羅的解析) 及

び TSQ Vantage (SRM 定量解析) を使用した。試料のイオン化は ESI positive ion mode により行った。

Nano-LC としては、HTC-PAL オートサンプラーを装備した ADVANCE NanoUPLC (AMR) を使用した。トラップカートリッジ及び分析用逆相カラムとしては、それぞれ CERI 社製 L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 mm, 12 nm)、CERI 社製 L-column Micro L-C18 (0.1 x 150 mm, 3 μm , 12 nm) を使用した。移動相には、A 溶媒 (0.1% TFA) と B 溶媒 (アセトニトリル) を使用した。流速は 300 nL/min とし、一分析当たりの溶出時間は 150 分 (グラジエント条件: 0-40%B/125 min 40-55%B/130 min 100%B/135 min 100%B/140 min 0%B/150 min) とした。

(9) SRM チャンネルの最適化

定量用標準品を利用して、ペプチド毎に定量用チャンネル、定性用チャンネル、内部標準用チャンネルを最適化し、トランジットイオン、コリジョンエネルギー及び S-lens 電圧を設定した。定量用及び内部標準用チャンネルとしては、最も感度良く検出されるプロダクトイオンを選択し、定性用チャンネルには、その他の特徴的な解列に由来する 4 種のプロダクトイオンを利用した。

(10) 蛋白質の同定、比較定量及び絶対定量

蛋白質の同定及び TMT 標識体の比較定量解析は、Thermo Scientific 社製蛋白質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェアを用いて行った。検索エンジン及びデータベースとしては、それぞれ Mascot 及び UniProtKB/Swiss-Prot を利用した。非標識条件下における蛋白質の多変量解析はメディカルプロテオスコープ社製 i-RUBY ソフトウェアを用いて行った。絶対定量解析は、Xcalibur QUAN Browser を用いて行った。

C . 研究結果

(1)高分子コーティング PC シートの検証

PBS 浸漬、培地浸漬及び未浸漬の各種 PC シートの表面特性を接触角測定、XPS 解析及び SEM 解析により評価した結果、いずれの高分子材料ともに良好にコーティングされており、PBS 及び培地浸漬後も剥離しないことが確認された。

(2)血液適合性評価マーカ候補の選定

PVP 含有 PSF、PMEA、PHEMA 及び MEA/HEMA ランダム共重合体への蛋白質吸着挙動を解析し、過去に実施した対照材料（一般プラスチック 6 種類、化学処理チタン 6 種類）への蛋白質の吸着挙動を踏まえて比較検討した。その結果、1) 内因系血液凝固活性化リガンドとして VTNC 及び FINC、2) 補体及び補助因子として C1r、C1s、C3、C5 及び FHR1、3) 血液凝固因子として FA7、FA9、FA12 及び FIBB、4) その他の蛋白質として GPX3 及び PLD5 が血液適合性評価マーカとして利用できることが示唆された。

(2)血液適合性評価マーカの検証

2-1. 標的プロテオミクスによる検証

血液適合性評価マーカ候補を対象とした SRM 解析を行った結果、PMEA、PHEMA 及び MEA/HEMA 系材料に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC、VTNC 量は、その他の材料への吸着量を例外なく下回っていた。最も良好な血液適合性を有すると思われる PMEA を基準とした場合は、C1r、C3、FHR1 が有用な評価マーカとなり得ることが示唆された。一方、FA12、FIBB、C5、GPX3、PLD5 は偽陰性を示す材料が存在するため、評価マーカとして不適であることが示唆された。

2-2. 金属ステント材料の蛋白質吸着特性

対照として使用した SUS と比較して、SUS/Si-DLC は C1 系補体と一部の抗体の吸着量が半減していたが、その他の血液凝固関連蛋白質の吸着挙動は SUS と同等であった。SUS/DLC には、

FIBB 及び FIBG が有意に吸着したが、その他の蛋白質群の吸着量は全体的に SUS を下回ることが確認された。一方、SUS/30%F/DLC、Co-Cr、Ni-Ti への血液凝固関連蛋白質の吸着量はいずれも低値であり、特に SUS/30%F/DLC 及び Ni-Ti では、C3、C4、CFAB、VTNC、VWF 等の吸着が顕著に抑制されていた。これらの蛋白質吸着特性から判定した各材料の血液適合性は SUS/30%F/DLC=Ni-Ti>Co-Cr>SUS/DLC>SUS/Si-DLC>SUS の順になることが明らかになった。

(3)新規高分子材料の血液適合性評価への応用

対照として使用した UHMWPE と比較して、いずれの高分子材料もアルブミン吸着量は低下していたが、PMe3A には補体、FINC 及び抗体が有意に吸着することが判明した。一方、PMEA と PTHFVE への血液凝固関連蛋白質の吸着量は全体的に少なく、血液適合性評価マーカとして着目している C1r、C1s、C3、FINC 及び VTNC ともに低値を示した。UHMWPE と比較して、PHEMA では FINC 及び ITA1 の吸着が 1/2 程度に抑制されていたが、補体及び抗体の中には有意に濃縮される蛋白質が散見された。PEOEVE の場合、C1q、C1s、C9、ITA1 及び VTNC のほか、フィブリノゲン、FINC 及び抗体の吸着量が低下する傾向が認められた。これらの蛋白質吸着挙動から判定した各高分子材料の血液適合性は PMEA=PTHFVE>>PEOEVE>PHEMA>UHMWPE>>PMe3A の順になることが明らかになった。

D . 考 察

本研究では、医用材料の血液適合性を蛋白質吸着特性から予測・評価する試験系の確立を目指し、23 種類の材料表面に吸着する血漿蛋白質を試料として、網羅的プロテオミクス解析による血液適合性評価マーカ候補蛋白質の検索と標的プロテオミクスによる評価マーカの検証を行った。また、検証実験の一環として、金属ステント材料の血液適合性を我々が選定した血液適

合性評価マーカ蛋白質の吸着特性から予測し、得られた成績を過去に報告された *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果と比較検討した。また、新規材料開発支援ツールとしての応用を目指し、新たに合成された生体適合高分子材料の血液適合性を蛋白質吸着挙動から予測・評価した。

(1) 高分子材料の水和状態

血液適合性材料として、超親水性表面、ミクロ相分離表面、細胞膜類似表面及び生理活性分子固定化表面等が開発され、その有効性が報告されて来たが、近年、材料表面の水和状態が血液適合性（抗血栓性）の要因である蛋白質吸着能や細胞接着能に深く関与することが明らかになりつつある。材料表面における水分子は存在様式により、超低温でも凍結しない不凍水、-50 付近で低温結晶を形成する中間水及び 0 で凍結する自由水に大別される。不凍水と自由水は多くの材料に共通して存在する水分子であるが、血液適合性の高い材料は不凍水と自由水のほか、中間水を持つことが確認されている。

細胞膜と類似したベタイン構造を持つ PMPC は中間水を有する代表的な高分子材料の一つであり、蛋白質吸着能や細胞接着能が非常に低く、血栓が形成されない性質を持つことから、血液適合性が要求される医療機器や医用材料の表面加工に利用されている。

PMEA も中間水を有する代表的な高分子材料である。PMEA は、有機溶媒への易溶解性、非水溶性、透明性、粘着性を併せ持っていることから様々な基材へのコーティングが可能である。また、PMEA 表面は、血漿蛋白質の吸着・変性が少なく、脱離速度も早い特徴を持つことが知られている。PHEMA も蛋白質吸着が比較的少ない生体適合性材料であり、コンタクトレンズをはじめとした各種の医療機器に利用されている。PHEMA は、PMEA と異なり -50 付近に中間水ピークが認められないが、核酸や多糖類等の生体成分と同様、低温凝固水を有する高分子材料であ

る。

PTHFVE、PEOEVE 及び PMe3A は PMEA 類縁体であり、いずれも中間水を有する化合物である。PTHFVE は含水量（42.4%）が比較的高い高分子材料であり、中間水の融解点が -7 付近に存在する。また、PTHFVE は血小板吸着数が低く、優れた抗血栓性を有することが予測されている。MEA とブチルアクリレート（BA）のランダム共重合体（MEA/BA=30/70）である PMe3A の中間水量は 0.008 g/g であり、PMEA（0.042 g/g）と比較して低い値を示す。PEOEVE も中間水を有する化合物であるが、血小板粘着等をはじめとした各種特性は検証中である。

(2) 血液適合性評価マーカ候補蛋白質の選定

内因系血液凝固活性化リガンドであるコラーゲン、F1C 及び VTNC は GPVI 受容体等を介して直接的に血小板を活性化する機能を持つため、血液凝固を引き起こす重要な因子の一つとなる。VTNC は、血液適合性に劣る材料上で有意に濃縮されると共に、その同定精度も高いことから、血液適合性評価マーカとして利用できる可能性が高い。Mascot score から判断する限り、F1C の吸着量は材料毎に異なる可能性が示唆されたため、F1C もマーカ候補蛋白質として選定した。各材料には種々のコラーゲンが吸着したが、共通性が乏しく、同定精度も低いいため、マーカ候補蛋白質から除外した。

補体系には古典経路、第 2 経路及びレクチン経路があり、古典経路では抗原に結合した IgG 又は IgM 抗体の Fc 部分（H 鎖）に C1q が結合することが引き金となり、C1r 及び C1s を介して、C2 から C9 に至る一連の補体系が活性化される。第 2 経路では、抗体を介することなく C3 が直接結合し、幾つかの過程を経た後、C5 が活性化されて C6 から C9 補体の活性化が誘導される。レクチン経路では、菌体表層に存在するマンナンとレクチン等のマンナン結合蛋白質が結合することにより MASP が活性化される。MASP は C1s

と類似した作用を持ち、C4 を活性化することにより C3 及び C5 から C9 補体を活性化する。すなわち、補体系においては C1 系、C3、C5 及び MASP が重要な役割を占める。血液適合性に劣る材料上には、C1r、C1s、C3 及び C5 が顕著に吸着した。PMEA 表面上では、これらの補体成分が濃縮される現象は観察されないが、水酸基を有する PHEMA 系材料や PVP 含量が比較的低い PSF 材料等では顕著に濃縮される。また、各補体因子の同定精度も高いことから、これら 4 種類の補体成分をマーカー候補蛋白質として選定した。MASP2 の吸着挙動についても興味ある結果が得られたが、MASP は酢酸セルロース等の糖質系材料との親和性が非常に高く、その他の材料への吸着量と比較することが難しいため、マーカー候補蛋白質から除外した。

補体系の活性化には種々の補助因子が必須である。各補助因子の吸着特性を解析した結果、FHR1 が上記 4 種の補体成分と類似した挙動を示すことから、同因子もマーカー候補蛋白質として選定した。

外因系血液凝固は組織損傷時に放出される組織トロンボプラスチンが引き金となり、FA7 が活性化されることにより一連の血液凝固カスケードが惹起される。また、血液が血管内皮細胞下の組織コラーゲンに接すると血液凝固カスケードの FA12 が活性化され、最終的にフィブリンの重合に至る。すなわち、血液凝固カスケードにおいては、FA7 と FA12 が重要な役割を果たしている。両因子は PVP 含有 PSF 材料上で濃縮される傾向があるが、MEA/HEMA 系材料では顕著な吸着が認められないことから、血液適合性評価マーカーとして利用できる可能性が高い。FIBB も同様な吸着挙動を示すことから、マーカー候補蛋白質として選定した。また、FA9 は PVP 含有 PSF 及び MEA/HEMA 系材料上で顕著に濃縮されたが、Mascot score から判断する限り、その吸着量は材料毎に異なる可能性が示唆されたため、FA9 もマーカー候補蛋白質として選定した。

ホスホリパーゼ群及びセロトニン受容体群は血液凝固に關与する主要な蛋白質の一つであるが、後述するサイトカイン類と同様、Mascot score と Peptide count の値を考慮して、マーカー候補蛋白質から除外した。しかし、PLD5 は PMEA 表面以外の多くの材料上で有意に濃縮されると共に、リン脂質をリン酸エステル部分で切断することにより、血液凝固に關与する陰性荷電リン脂質を遊離させる機能を持つ可能性があるため、マーカー候補蛋白質として選定した。

血液凝固に關与しないと思われる蛋白質群であっても、最も優れた血液適合性を示す PMEA 表面への吸着量が少なく、その他の材料上で顕著に濃縮される蛋白質は血液適合性評価マーカーとして利用できる可能性が非常に高い。各種蛋白質の吸着挙動を解析した結果、GPX3 は MEA/HEMA 系材料への吸着量が少なく、PVP 含有 PSF 材料及び 6 種類の対照材料上で顕著に濃縮されることが判明したため、同蛋白質を有益なマーカー候補蛋白質として選定した。

PVP 含有 PSF 材料、MEA/HEMA 系材料及び過去に測定した各種の対照材料には、多くのリポ蛋白質が吸着した。APOA 系蛋白質は線溶系蛋白質であるプラスミノゲンに類似した構造を持つため、プラスミノゲンに由来する線溶系の活性を低下させることが示唆されている。また、リポ蛋白質の主要構成糖脂質であるスルファチドは血液凝固阻害作用を持つことが報告されているが、リポ蛋白質と血液凝固の相関性には不明な点が多いため、マーカー候補蛋白質から除外した。IL-1 等の炎症性サイトカインは細胞膜表面に組織因子を出現させる機能を持つことが知られている。本研究において解析した各種材料上には、幾つかのインターフェロン及びインターロイキン群が有意に吸着したが、血液適合性との相関性が不明であると共に、いずれの蛋白質ともに Mascot score 及び Peptide count が低く、その同定が不確かなため、サイトカイン類もマーカー候補蛋白質から除外した。抗凝血作用を有

する蛋白質群中、ANT3、PLGB 及び PLMN は幾つかの PSF 材料上で濃縮されたが、これらの蛋白質は血液凝固を抑制する線溶系蛋白質であると共に、その他の多くの材料への顕著な吸着が認められなかった。血小板 顆粒成分である A1AT は、Mascot score 及び Peptide count とともに高く、その同定は確かであるが、各材料上で濃縮されなかった。また、カリクレイン・キニン群として同定された KNG1 も、PSF3-5 を除き、対照材料を含めた多くの材料上で濃縮されなかったことから、これらの蛋白質もマーカ候補から除外した。

(3) 血液適合性評価マーカの検証

2-1. 標的プロテオミクス

23 種類の材料に吸着する血漿蛋白質を試料として、13 種類の血液適合性評価マーカ候補蛋白質（ペプチド）を SRM 解析により絶対定量した。各ペプチドの分離状況は良好であり、各検量線の相関係数は 0.9966 から 1.0000 であり、いずれのペプチドとも低濃度領域から高濃度領域まで良好な相関が得られた。また、各トランジットイオンの定量・定性用チャンネルのイオン検出状況も良好であった。

MEA/HEMA 系材料に吸着する FA7、FA9、C1s、FINC 及び VTNC 量は、その他の材料への吸着量を例外なく下回っており、特に C1s と VTNC の吸着量は MEA/HEMA 系材料とその他の材料間で大きく異なることが確認されたことから、これらの 5 種類の蛋白質は血液適合性評価マーカとして利用できることが示唆された。MEA/HEMA 系材料表面への FA12、FIBB、C1r 及び GPX3 吸着量も、その他の材料を下回っていたが、MEA/HEMA 系材料と近似する吸着挙動を示す対照材料が若干存在した。また、C3、C5、FHR1 及び PLD5 は偽陰性を示す材料が存在したが、最も良好な血液適合性を有すると思われる PMEAA を基準とした場合は、C1r、C3、FHR1 も評価マーカとして利用できる可能性が示唆された。

2-2. 過去の報告との相関性評価

近年、狭心症、心筋梗塞及び重症下肢虚血等の虚血性疾患に対してステント治療が盛んに行われている。従来の金属ステントのプラットフォームは SUS、Co-Cr、Ni-Ti 等の金属から構成されている。一方、ステント治療の有害事象として観察される再狭窄とステント血栓症の問題は未解決であり、新規材料や新たな *in vivo* 評価法の開発が進められている。

DLC は低摩擦や低摩耗、高硬度、化学的安定性等様々な特性を有するため、1990 年代よりバイオマテリアル分野への応用研究が始まった。ステントへの応用は 2000 年頃から報告されており、DLC コーティングによる抗血栓性効果や新生内膜増殖の抑制効果が血液回路を用いた *in vitro* 実験や動物実験等により明らかとされた。これらの結果に基づき DLC 系コーティングステントが発売されたが、臨床使用においては従来の金属ステントと比較して著明な再狭窄抑制効果が認められなかった。一方、DLC にフッ素を組み込むことにより、疎水性、柔軟性及び抗血栓性を付与したフッ素添加 DLC (F-DLC) は、SUS や DLC と比較して、ヒト血液を利用した実験において血小板付着抑制能を示すと共に、ラット皮下における炎症反応を過度に惹起しないことが確認されている。F-DLC は DLC と比較して血小板の活性化を抑制する効果や蛋白質吸着を減少させる効果を有することも *in vitro* 実験において確認された。近年、ミニプタを用いた動物実験において、F-DLC ステント留置後の新生内膜の増殖から軽度退縮に至る経時的変化が血管内超音波法により評価された結果、従来の金属ステントと比較して、F-DLC ステントの狭窄率ピークは有意に低下することが明らかにされている。

本研究において使用した SUS/30%F/DLC に吸着する総蛋白質量は、その他の材料と比較して若干高い傾向が認められたが、血液凝固関連蛋

白質の吸着は SUS や Co-Cr と比較して顕著に抑制されており、ヒト血液を用いた *in vitro* 血小板吸着試験やミニブタを使用した *in vivo* 再狭窄評価試験と一致する成績が得られた。本研究において確認された SUS/DLC 及び中間層にケイ素を導入した SUS/Si-DLC の血液適合性は SUS 以上、Co-Cr 以下であり、この成績は DLC ステントが臨床使用において顕著な再狭窄抑制効果を示さなかった報告と一致していた。

血管ステント留置後の再狭窄は、ステント自体の血液適合性、血管内壁に対する物理的刺激による損傷又は炎症誘導のほか、溶出する金属イオン等によるアレルギー性炎症反応の惹起に起因する。Ni-Ti は、総蛋白質吸着量が最も低く、血液凝固関連蛋白質の吸着挙動から、SUS/30%F/DLC に匹敵する優れた血液適合性を有することが予測された。しかし、従来の金属ステントと比較して、SUS/30%F/DLC の再狭窄率は有意に低いことが過去に報告された *in vivo* 試験により示唆されていることから、血管ステントの生物学的安全性は血液適合性のほか、材質や形状の相違による周辺組織への影響も含めて、総合的に評価する必要があることが再確認された。

(4) 新規高分子材料の血液適合性への応用

現在までに選定した血液適合性評価マーカ候補に着目して、新規高分子材料である PTHFVE、PEOEVE 及び PMe3A の特性を検討した結果、PMe3A は対照として用いた UHMWPE よりも血液適合性に劣る成績が得られた。これは PMe3A の中間水量が PMEA と比較して少ないと共に、中間水を持たない BA ユニットが密集する構造が分子中に存在する可能性があることに由来すると考えられる。後者の問題は、ランダム共重合体ではなく、ユニット共重合体を合成することにより解消できるため、今後、分子設計を最適化する必要があると思われる。一方、血液適合性評価マーカ候補蛋白質の吸着挙動が PMEA とほぼ同等

である PTHFVE は PMEA に匹敵する優れた血液適合性を有することが示唆された。PEOEVE への血液凝固関連蛋白質の吸着は抑制される傾向が認められたが、C1 系及び C9 を除く補体の吸着量が UHMWPE と同等であると共に、FINC 及び VTNC の吸着能も十分抑制されていないことから、PEOEVE の血液適合性は PMEA 及び PTHFVE と比較して劣ることが示唆された。水酸基を有する PHEMA は UHMWPE とほぼ同等の補体吸着特性を示し、PMEA や PTHFVE と異なり、補体を吸着し易い性質を有することが再確認された。

E . 結 論

医用材料の血液適合性は、その表面に吸着する血漿蛋白質の種類及び量から予測・評価できることが示唆された。今後、標的プロテオミクスにおける標準誤差が統計学的に 95%信頼区間に入るまで繰り返し測定 (n=10) を行い、我々が選定した血液適合性評価マーカの有用性を更に検証する。また、本評価法を公定法として広めるため、ELISA 等の簡易な測定系を利用した試験法の開発を目指す。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表等

<誌上発表>

- 1) Haishima Y, Isama K, Hasegawa C, Yuba T and Matsuoka A. A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration. J. Biomed. Mater. Res. Part A, 101:2630-2643 (2013).
- 2) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y and Matsuoka A. Calcium-incorporated titanium surface influence the osteogenic

- differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 101: 2573-2585 (2013).
- 3) Hoshino T, Narukawa Y, Haishima Y, Goda Y and Kiuchi F. Two new sulfated oleanan saponins from *Achyranthes* root. *J. Nat. Med.*, 67:386- 389 (2013).
- 4) 中村里香, 酒井信夫, 藪島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子. ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 131:50-57 (2013).
- 5) Haishima Y, Hasegawa C, Nomura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K, Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, Niimi S. Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 102B:1809-1816 (2014).
- 6) Haishima Y, Kawakami T, Hasegawa C, Tanoue A, Yuba T, Isama K, Matsuoka A, Niimi S. Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, 102B: 721-728 (2014).
- 7) 藪島由二. 第1部: 医療機器市場の拡大と新規製品の開発: 開発, 上市化, 市場確保において留意すべきポイント. 生体適合性制御と要求特性掌握から実践する高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略(監修: 田中 賢). *サイエンス&テクノロジー*, pp.3-21 (2014).
- 8) 新見伸吾, 梅津光夫, 伊関 洋, 岩崎清隆, 笠貫 宏, 原田 昇, 光石 衛, 北森武彦, 鄭 雄一, 中岡竜介, 藪島由二. 早稲田大学先端生命科学センター (TWIns) 及び東京大学大学院工学系研究科との連携による革新的医薬品・医療機器・再生医療製品等実用化促進事業. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 132:16-18 (2014).
- 9) 中岡竜介, 藪島由二, 新見伸吾. 医療機器・材料の国際標準化動向. *バイオマテリアル生体材料*, 33(1):56-63 (2015).
- 10) Haishima Y, Kawakami T, Fukui C, Tanoue A, Yuba T, Ozono S, Kumada H, Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Fujisawa A, Yamasaki K, Nomura Y, Isama K, Chung U, Ogawa K, Niimi S, Yoshida M. Characterization of alternative plasticizers in polyvinyl chloride sheets for blood containers. *J. Vinyl Add. Technol.*, in press (2015).
- <学会発表>
- 1) 藪島由二. 第7部: 発熱性物質試験. 説明会: 医療機器の生物学的安全性評価に関連する規格等の最近の改正について(2012年5月・東京).
- 2) 藪島由二. 第7部: 発熱性物質試験: 各試験法の特徴と操作方法等について. 医療機器の生物学的安全性試験法講習会(2012年9月・東京).
- 3) 藪島由二, 福井千恵, 柚場俊康, 松岡厚子. 溶血性試験用陽性対照材料の開発と性能評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012 (2012年11月・仙台).
- 4) 藪島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 伊佐間和郎, 松岡厚子. DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発: 可塑剤溶出量と溶血性の関係について. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012 (2012年11月・仙台).
- 5) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也. 医用高分子材料の表面

- 近傍における水和状態のシミュレーション的評価 .日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012年11月・仙台).
- 6) 迫田秀行, 藪島由二, 松岡厚子 . スクアレンによる超高分子量ポリエチレンの劣化機構に関する検討 .日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012年11月・仙台).
- 7) 河野 健, 澤田留美, 伊佐間和郎, 藪島由二, 松岡厚子 . チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導 .日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012年11月・仙台).
- 8) 藪島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 伊佐間和郎, 松岡厚子 . DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発: 可塑剤溶出量と溶血性の関係について . 日本薬学会第 133 年会(2013年3月・横浜).
- 9) 藪島由二, 澤田留美, 福井千恵, 松岡厚子 . 間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について: 蛋白質発現の網羅的解析による検討 . 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013年3月・横浜).
- 10) 澤田留美, 藪島由二, 福井千恵, 河野 健, 松岡厚子 . 間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について: 遺伝子発現の網羅的解析による検討 . 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013年3月・横浜).
- 11) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, and Matsuoka A. The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting (Jun., 2013 in Boston).
- 12) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 瀬川勝智, 中野達也 . 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析 (第 2 報). 第 42 回医用高分子シンポジウム (2013年7月・青海).
- 13) 藪島由二, 福井千恵, 長部真博, 上野良之, 菅谷博之, 棚橋一裕, 野村祐介, 松岡厚子, 新見伸吾 . ポリスルホン材料表面に吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析: PVP 含量と血液適合性の相関性について . 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 14) 藪島由二, 福井千恵, 田中 賢, 野村祐介, 松岡厚子, 新見伸吾 . HEMA/MEA ランダム共重合体表面に吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析: 血液適合性評価マーカの選定について . 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 15) 野村祐介, 河上強志, 福井千恵, 柚場俊康, 新藤智子, 坂口圭介, 谷川隆洋, 犬飼香織, 竹ノ内美香, 伊佐間和郎, 松岡厚子, 新見伸吾, 藪島由二 . 溶血性試験用陽性対照材料 Genapol X-080 含有 PVC シートの性能評価 . 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 16) 加藤玲子, 藪島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾 . 生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響(2): タンパク質発現の網羅的解析 . 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 17) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 新見伸吾, 瀬川勝智, 中野達也 . 血液適合性評価のための中間水同定シミュレーション . 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 18) 中岡竜介, 比留間 瞳, 藪島由二, 新見伸吾 . SAM を利用したペタイン構造模倣表面調製とその構造に関する研究 . 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013年11月・船堀).
- 19) 中村里香, 藪島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 安達玲子, 手島玲子 . 加水分解小麦(グルパール 19S)に特異的に発現するペプチドの探索及び同定 . 第 50 回全国衛生化

- 学技術協議会年会 (2013年11月・富山).
- 20) 藪島由二, 福井千恵, 山崎佳世, 野村祐介, 小園 知, 熊田秀文, 藤澤彩乃, 井上 薫, 森川朋美, 市村亮平, 前田 潤, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 浜田信城, 鄭 雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田 緑. DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発: ラット精巢に及ぼす DOTP の影響評価. 日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月・熊本).
- 21) 藪島由二, 福井千恵, 澤田留美, 河野 健, 野村祐介, 新見伸吾. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖能に対する抗酸化剤の影響評価. 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014 年 3 月・京都).
- 22) Uematsu M, Haishima Y, Nakaoka R, Niimi S, Segawa K, and Nakano T. A novel evaluation methodology of materials for medical devices based on molecular dynamics simulation. The 15th International Conference on Biomedical Engineering (Dec., 2013 in Singapore).
- 23) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 中野達也, 瀬川勝智, 新見伸吾. 医用材料の生体適合性評価指標開発を目的とした表面の水和上体に関する分子動力学シミュレーション. 第 54 回日本生体医工学会大会 (2014 年 5 月・名古屋).
- 24) 中岡竜介, 藪島由二, 新見伸吾. 橋渡し研究及び国際標準化の行政的支援. 第 53 回日本生体医工学会大会 (2014 年 6 月・仙台).
- 25) 藪島由二, 福井千恵, 比留間 瞳, 野村祐介, 田中 賢, 新見伸吾. 蛋白質吸着挙動に基づく血液適合性評価マーカの検証に関する研究. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 26) 藪島由二, 福井千恵, 山崎佳世, 野村祐介, 小園 知, 熊田秀文, 藤澤彩乃, 井上 薫, 森川朋美, 市村亮平, 前田 潤, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 鄭 雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田 緑. 新規血液バッグ用代替可塑剤 DOTH のラット亜慢性毒性試験. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 27) 藪島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 向井智和, 野村祐介, 伊佐間和郎¹, 新見伸吾. 新規血液バッグ素材 DOTH/DINCH 配合 PVC シートの性能評価. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 28) 野村祐介, 福井千恵, 柚場俊康, 新藤智子, 坂口圭介, 谷川隆洋, 杉山知子, 竹ノ内美香, 新見伸吾, 藪島由二. 簡易溶血性試験法の性能評価と公定法との比較検証. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 29) 野村祐介, 福井千恵, 戸井田 瞳, 新見伸吾, 宮川 伸, 金 玲, 中村義一, 藪島由二. RNA アプタマーを用いた新規医用材料の開発. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 30) 加藤玲子, 藪島由二, 福井千恵, 比留間 瞳, 宮島敦子, 新見伸吾. ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 31) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 中野達也, 瀬川勝智, 新見伸吾. 分子動力的シミュレーションによる PMEA 分子に存在する水の挙動解析. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 32) 迫田秀行, 柚場俊康, 向井智和, 新見伸吾, 藪島由二. 新規血液バッグ素材 DOTH/DINCH 配合 PVC シートの力学特性. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014 年 11 月・船堀).
- 33) 藪島由二. 医療機器・再生医療等製品分野におけるエンドトキシンの諸問題. 第 30 回 GMP

とバリデーションをめぐる諸問題に関する
シンポジウム(2015年3月・品川).

- 34)Olsen DS, Lee M, Turley A, Sasaki S,
Yamasaki K, Fukui C, Nomura Y, Kato R, Yuba
T, Sakaguchi K, Haishima Y. Extractable
positive control for in vitro skin
irritation testing of medical devices.
54th Annual Meeting and ToxExpo (March
22-25, 2015, San Diego).

<知的財産権の出願・登録状況>

- 1)特願 2013-104082(平成 25 年 5 月 16 日)「血
液バッグ」. 発明者: 藪島由二, 河上強志, 福
井千恵, 田上昭人, 伊佐間和郎, 松岡厚子, 柚
場俊康 .
- 2)藪島由二, 福井千恵, 河上強志, 迫田秀行,
野村祐介, 伊佐間和郎, 新見伸吾, 柚場俊康,
向井智和, 清麻里子. 「医療用バッグ」. 出願
番号: 特願 2015-17514, 出願日: 2015 年 1
月 30 日 .

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）

平成 24～26 年度 分担研究総合報告書

（分担研究課題名）医用材料の血液適合性を含む生体適合性における細胞応答に関する研究

研究分担者 宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
研究協力者 酒井 恵子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
中岡 竜介 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
比留間 瞳 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
田中 賢 山形大学大学院理工学研究科

研究要旨

医用材料の生体適合性は、材料表面の物理学的特性により大きく影響される。本研究では、平成 24 年度に、チタン系金属、合成高分子材料を培養基質として、様々な培養細胞株を用い、細胞の増殖、コロニー形成、細胞毒性、遺伝毒性等に及ぼす影響について基礎的な検討を行った。純チタン (Ti) ディスクを用いて CHL 細胞の増殖、細胞毒性、遺伝毒性について検討した結果、純 Ti 上で観察されたコロニーは、対照プレートに比べてコロニーの大きさは小さめで、数も若干少なかったが、いずれの場合も感受性に差はなかった。MPC ポリマーコートプレートに CHL、A549、RAW264.7 細胞を播種し、細胞形態、増殖について検討した結果、CHL 細胞はスフェロイドを形成し、A549 及び RAW264.7 細胞はブドウ塊状に増殖した。細胞毒性では、細胞株により被験物質に対する感受性に差がみられた。CHL 及び A549 細胞の遺伝毒性には差がなかった。混合比の異なる HEMA/MEA シートでは、PHEMA を除くシートで実施した CHL 細胞増殖試験において、HEMA/MEA シート間で増殖に差がなかった。

平成 25、26 年度の研究においては、血液適合性試験の各評価項目の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うため、試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行い、生体適合性の異なる高分子材料を用いて実際に血液適合性試験を行なった。陽性対照 PC シートを用いて血液適合性試験を実施し、TAT、 β -TG、SC5b-9 の各マーカー蛋白質量を測定した結果、インキュベーション時間に応じて、各マーカー量の増加が観察された。TAT、 β -TG では PC シートの共存により、マーカー量の増加が観察された。混合比の異なる HEMA/MEA シートを用いて血液適合性試験を実施し、蛋白質マーカーを指標とする各評価項目の特性について検討した結果、TAT、 β -TG、C5a、SC5b-9 では、HEMA/MEA シートにおける MEA 量の増加に伴うマーカー産生の減少が観察された。TAT、 β -TG では、対照シート (PET、PC) におけるマーカー産生の増加が観察されたことから、高分子材料の血液適合性は、TAT、 β -TG を指標として評価するのが適している可能性が示された。更に、新規材料 PMe3A、PEOEVE、PTHFVE に対して血液適合性試験を実施し、TAT 及び β -TG の活性化について検討したところ、両マーカー共に、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE 順に値が小さくなっていった。今後、引き続き生体適合性の異なる高分子材料を用いて血液適合性試験を実施し、各試験法の特性、妥当性について総合的に検証を進め、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集する予定である。

A . 研究目的

医用材料の生体適合性は、材料表面の物理学的特性により大きく影響される。チタン系金属は、強度、軽さ、耐食性、耐熱性を備え、アレルギー性も低く、優れた生体適合性を有することから、医用材料として汎用されている。一方、2-

methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer (MPC ポリマー)、poly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)等の生体適合性を有する合成高分子材料は、蛋白質、ペプチドに対する吸着抑制、細胞接着抑制能を示すことから、人工臓器、血液接触医療用チューブ、カテーテル、コンタクトレンズ等の医療機器に応用されている。一方、チャイニーズ・ハムスター由来線維芽細胞株 (CHL) は、医薬品、化学物質、医療機器等の安全性評価に長年使用されており、細胞毒性、遺伝毒性に関する多くのデータの蓄積を有している。平成 24 年度の研究では、チタン系金属、合成高分子が、培養基質として、細胞の増殖、コロニー形成、細胞毒性、遺伝毒性等に及ぼす影響について、基礎的な検討を行った。さらに、CHL 細胞に加えて、ヒト肺由来上皮様細胞株 A549、マウス由来マクロファージ系細胞株 RAW 264.7 等の培養細胞株を用い、合成高分子基質上における細胞毒性の感受性について、比較検討を行った。

平成 25 年度より、医用材料の血液適合性に焦点絞った研究を開始した。循環器系医療機器の基本的かつ最も重要な特性として、血液との接触があげられる。特に埋植する機器では、長期間にわたって血液凝固、血栓形成を起こさないことが要求される。医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、血液に接触する製品については、血液適合性試験が要求される。本邦においては、図 12 に示すように、平成 15 年 2 月に発出された「医療用具の製造（輸

入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」（厚生労働省 薬食機発 0213001 号 通知）平成 15 年 3 月に発出された「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」（医療機器審査 No.36 事務連絡）に基づいて、長年、生物学的安全性試験が実施されてきた。この事務連絡中で、血液適合性試験においては ISO 10993-4(1992)、ISO/DIS 10993-4(2000)、ASTM F756-93 が引用規格にされており、評価概要、溶血性試験、試料の調製法について言及されていた。これらの通知及び事務連絡に対して見直しが進められ、平成 24 年 3 月に「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」（薬食機発 0301 第 20 号 通知）が発出され、現在はこの通知を元に、生物学的安全性試験が行われている。血液適合性試験に関しては、2002 年に発行された ISO 10993-4 (Biological Evaluation of Medical Devices - Part 4, Selection of Test for Interactions with Blood) 本体及び 2006 年に発行された Amendment が、国際的な規格となっているが、2009 年より改訂作業が進められている。本邦において平成 24 年発出された第 20 号通知では、この ISO 10993-4(2002) /Amd.1(2006)及び ASTM F756-08 が、引用規格となっている。これらの通知、規格において、試験について詳細な方法が規定されているのは、赤血球に対する影響を評価する試験法である溶血性試験についてだけであり、その他の評価項目については、詳細は規定されていない。溶血性試験についても、米国で規格化された NIH 法、ASTM 法及び日本の MHLW 法の 3 種の試験法が存在し、試験法により判定に差が生じる例もあり、国際的にみても整備されていない状況にある。溶血性試験については、ISO 10993-4 の改訂作業の一部として、

ISO/TC194 WG9 が主体となって、溶血性試験のラウンドロビン試験が進められている。平成 24 年 厚労省発出の第 20 号通知「第 8 部 血液適合性試験」においては、血液適合性試験の標準的な評価項目として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の 5 つの試験項目が挙げられており、それぞれの試験項目について標準的な評価項目が挙げられている（図 13）。これらの項目の中から、製品の用途、血液との接触期間等に応じて選択、実施されている。特に、ヒトの血液を用いて実施する試験法については、試験系の適切性、検出感度などについての検証が十分に行われていない。

本研究では、「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」の一環として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の各試験法の国際整合に必要な基礎データの収集を行い、試験の妥当性についての総合的な検証を行うことを目的とする。評価においては、本研究班において、医用材料/細胞界面特性に着目した、生体反応、細胞機能等への影響におけるマーカー検索、分子動力学的シミュレーショングループの研究成果と合わせ、新たな評価手法の開発を目指す。本研究の成果は、新規医療機器の開発及び承認審査の迅速化に寄与するほか、ISO や JIS 規格にフィードバックできる等、厚生行政的にも重要であると思われる。

平成 25 年度は、血液適合性試験の各評価項目に関する総合的な検証を行うため、試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行った。平成 26 年度の研究においては、陽性対照として PC シートを用い、インキュベーション時の基礎的な実験条件について、血液凝固においてはトロンビン-抗トロンビン複合体 (TAT)、血小板放出因子 (β -トロンボグロブリン (β -TG))、補

体系では補体活性化産物 SC5b-9 の各マーカー蛋白質量を指標として検討を行なった。次に、混合比の異なる 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) / 2-methoxyethyl acrylate (MEA)シートを用いて血液適合性試験を実施し、血液凝固においては TAT、血小板においては血小板放出因子 β -TG、補体系では補体活性化産物 (C3a、C5a、SC5b-9) を指標とする評価項目について検討を行い、各試験法の特長、妥当性についての検証、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集した。更に、新規材料 poly 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl acrylate-co-butyl acrylate (30:70 mol%) (PMe3A)、poly (2-ethoxyethyl vinyl ether) (PEOEVE)、poly (tetrahydrofuran-2-ylmethyl vinyl ether) (PTHFVE) について、PHEMA、PMEA と共に血液適合性試験を行い、血液適合性を評価した。

B . 研究方法

1. 材料

1) 純チタン (Ti) ディスク

純 Ti ディスク (33.5 mm x 2 mm (表面研磨仕上げ Ra = 0.4 程度)、ナカシマメディカル(株))を用いた。

2) 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer コートプレート (MPC プレート)

MPC プレートとして、LIPIDURE[®] コートプレート (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)) の 6-well または 96-well プレートを用い、対照として、Nunc 社のプレートを使用した。

3) 合成高分子材料

Pre-coated PET シート (34 mm、厚さ 0.1mm、三菱樹脂、H24 年度) または、Polycarbonate (PC) シート (34 mm、厚さ 0.1mm、菅原工業、H25、26 年度) に、2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) : 2-

methoxyethyl acrylate (MEA)= 100% : 0% (PHEMA)、 75% : 25% (H75M25)、 50% : 50% (H50M50)、 25% : 75% (H25M75)、 0% : 100% (PMEA) の 5 段階の混合比の HEMA/MEA ランダム共重合体ポリマー溶液を両面コートした。コート方法は、1 wt % (MeOH) 溶液を、滴下量 100 μ L でスピコート (4000 rpm, 10 sec, 表裏各 2 回コート) した。対照シートとして、PC シート (未コート) 及び Polyethylene terephthalate (PET) シート (未コート) を用いた。HMEA/MEA コートシートの接触角を測定した。接触角は、HMEA/MEA コートした PC シートに Milli Q 水 2 μ L を滴下して、20 秒後に接触角を測定した。測定は 5 回行い平均値を求めた。PBS 浸漬の接触角は、シートを PBS に浸漬し 37

で一晩インキュベートし、シートを Milli Q 水で洗浄後、室温で乾燥したシートを用いて同様に測定した。

新規材料新規材料 poly 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl acrylate-co-butyl acrylate (30:70 mol%) (PMe3A)、poly (2-ethoxyethyl vinyl ether) (PEOEVE)、poly (tetrahydrofuran-2-ylmethyl vinyl ether) (PTHFVE)についても同様に PC シートにコートして用いた。

HEMA/MEA、PMe3A、PEOEVE、PTHFVE 液は、共同研究者の田中先生より供与いただいた。

2. 細胞株および培養方法

チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 CHL は、国立衛研で樹立された株で基盤研の JCRB 細胞バンク (吹田) American Type Culture Collection (ATCC) (USA)にも登録され、遺伝毒性試験に汎用されている。A549 はヒト肺由来細胞株で、JCRB 細胞バンク (吹田) より購入した。

RAW264.7 細胞はマウスの単球性白血病由来のマクロファージ系細胞株で、International Alliance for NanoEHS Harmonization (IANH)より入手した。

CHL 細胞は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、penicillin-streptomycin を含む Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO)にて、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂-95% air インキュベーターで培養した。A549 細胞は、10% 非働化 FBS、1% non-essential amino acid (NEAA) (GIBCO)を含む MEM にて、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂-95% air インキュベーターで培養した。RAW264.7 細胞は、10% 非働化 FBS、2 mM L-glutamine (GIBCO)、penicillin-streptomycin を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO)にて、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂-95% air インキュベーターで培養した。各細胞株は、3-4 日ごとに継代した。

3. 純 Ti ディスクを用いた試験

1) 細胞増殖試験

35 mm プレート (IWAKI) に純 Ti ディスクを配置し、CHL 細胞を播種 (2×10^4 cells/ 2 mL) し、4 日間に渡って細胞数をカウントした。

2) 細胞毒性試験・コロニー法

医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、100 個の CHL 細胞を 35 mm プレートに配置した純 Ti ディスク上及び、対照の 35 mm プレートに播種し、翌日、被験液 (金属化合物) を添加後、さらに 5 日間または 7 日間静置培養した。その後、ギムザ染色してコロニーを計測し、陰性対照群のコロニー数に対する割合 (コロニー形成率) を算出した。

3) 遺伝毒性試験・in vitro 小核試験

CHL 細胞を 35 mm プレートに配置した純 Ti ディスク上及び、対照の 35 mm プレートに播種 (3×10^4 cells/ 2 mL) し、

翌日、被験液を添加して 48 時間培養した。トリプシン処理により細胞を回収し、低張処理、固定処理を行い、小核観察用標本作製した。標本はアクリジン オレンジで染色し、核及び細胞質を蛍光顕微鏡で観察した。陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC) (Kyowa Hakko Kirin) を用いた。

4. MPC プレートを用いた試験

1) 細胞増殖試験

6-well MPC プレートに、CHL、A549、RAW264.7 細胞を播種 (2×10^4 cells/2 mL) し、1 週間に渡って、形態観察及び細胞数をカウントした。対照として、Nunc 社の 6-well プレートを用いた。

2) 細胞毒性試験・ATP 法

CHL 細胞 (10×10^4 cells/well)、A549 細胞 (0.5×10^4 cells/well) 及び RAW264.7 細胞 (10×10^4 cells/well) を、96-well MPC プレートに播種し、24 時間後に被験液 (金属化合物) を添加し、さらに 6 時間及び 24 時間培養した。細胞を蛍光測定用の白色プレートに移し、CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay 試薬 (ATP 試薬, Promega) を添加し、遮光、室温で 45 分または 90 分間反応させた。発光シグナルをルミノメーターで測定した。対照として、Nunc 社の白色 96-well プレートに細胞を播種して同様の試験を行った。

3) 遺伝毒性試験・in vitro 小核試験

CHL 細胞及び A549 細胞を 6-well MPC プレート及び対照 Nunc 社プレートに播種 (3×10^4 cells/2 mL) し、翌日被験液を添加して 48 時間培養した。トリプシン処理により細胞を回収し、低張処理、固定処理を行い、小核観察用標本作製した。標本はアクリジン オレンジで染色し、核及び細胞質を蛍光顕微鏡で観察した。陽性対照物質として MMC を用いた。

5. HMEA/MEA シートを用いた試験

1) 培地浸漬試験

6-well プレート (Costar) に、5 種類の HEMA/MEA シート及び未コートシートを設置し、UV 滅菌 (5 min x 2) した。PBS または MEM 培地を 3 mL/well 添加し、一晚 CO₂ インキュベーターでインキュベートした。翌日シートを取り出し、水洗 3 回後風乾した。シート表面を SEM により観察した。

2) 細胞播種試験

6-well プレートに、5 種類の HEMA/MEA シート及び未コートシートを設置し、UV 滅菌 (5 min x 2) した。培地 3 mL を添加し、シート裏面の気泡を除去した。培地を除去し、シートを 6-well プレートに密着させた後、CHL 細胞液 (3×10^5 cells/3 mL) をシート全体に播種し、一晚培養した。形態観察後、シート上、6-well プレート上、培養上清に分けて細胞を回収し、細胞数を計測した。対照として、Costar 社の 6-well プレートに細胞を播種した。細胞回収後のシートは、水洗 3 回後風乾し、シート表面を SEM により観察した。

1) 細胞増殖試験

6-well プレートに、HMEA/MEA シート及び未コートシートを設置、UV 滅菌 (5 min x 2) した。培地 3 mL を添加し、シート裏面の気泡を除去した。培地を除去し、シートを 6-well プレートに密着させた後、CHL 細胞液 (3×10^5 cells/3 mL) をシート中心部に播種した。6-well プレートを 30 分間クリーンベンチ内で静置した後、CO₂ インキュベーターで培養した。4 日間に渡って、形態観察、細胞数を計測した。対照として、Costar 社の 6-well プレートに細胞を播種した。

6. 血液適合性試験

1) 採血

翼付針（テルモ、21G）を用い、組織因子を含む血液を除くため、まず 5 mL 注射筒（テルモ）で採血後、30 mL 注射筒（テルモ、予めヘパリン（田辺三菱製薬）final 2 U/mL 含有）で必要量の血液を採取した。

2) インキュベーション

3 もしくは 4 分割した被験シート 2 枚を重ねないように 15 mL チューブに入れ、6 mL の全血（6 cm² / 1 mL 全血）と 37 °C、2 時間、緩やかに振盪（60 rpm）した。チューブは横にして振盪し、15 分毎にチューブ回し、上下が入れ替わるようにした。

インキュベーションチューブ及びインキュベーション時間の検討においては、Polyethylene terephthalate（PET）（Corning）、polypropylene（PP）（SUMILON）、PP-low bind（SARSTEDT）を用い、その後の試験においては、PP-low bind を用いた。

3) サンプルング

インキュベーション開始時及びインキュベーション終了後、各試験項目に応じて血液をサンプルングした（図 14）。血液凝固因子測定用はクエン酸含有チューブ（テルモ）、血小板因子測定用は CTAD（citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole、血小板刺激抑制）含有チューブ（BD）、補体系測定用には、Futhan（Nafamostat Mesilate（補体分解阻害剤）鳥居薬品、final 5 µg/mL）添加 EDTA-2K 含有チューブ（テルモ）にサンプルングし、図 14 に示すように水中静置、遠心等の処理を行った後、

分注して -30 °C で保存した。溶血性試験は、全血をそのままサンプルングして用いた。

4) 溶血性試験

各時間にサンプルングした全血を、PBS 又は蒸留水と血液を 7:1 で穏やかに転倒混和した。750 x g で 5 分間、冷却遠心し、

上清を分取した。PBS で 10 倍希釈し、576 nm 及び 540nm の吸光度を測定した。ASTM 法ではクエン酸処理血、NIH 法ではシュウ酸処理血、MHLW 法では脱繊維血を試験に用い、先に血液を希釈後、接触試験を行い、吸光度を測定することから、本研究における結果は、参考データとした。溶血率（%）は、（試験液上清の平均吸光度 - 陰性対照上清の平均吸光度）/（陰性対照完全溶血上清の平均吸光度 - 陰性対照上清の平均吸光度）x 100 で算出した。

5) 血液凝固系の測定

TAT の測定は、凍結保存したクエン酸処理血を ELISA（エンザイグノスト TAT micro、SIEMENS）により測定した。

6) 血小板活性化の測定

β-TG の測定は、凍結保存した CTAD 処理血を ELISA（アセラクロム β-TG TMB、Roche）により測定した。

7) 補体系の測定

C3a、C5a、SC5b-9 の測定は、凍結保存したフサン/EDTA-2K 処理血を、ELISA により測定した。測定キットは、C3a（MicroVue C3a plus EIA Kit、QUIDEL）、C5a（MicroVue C5a EIA Kit、QUIDEL）、SC5b-9（MicroVue SC5b-9 plus EIA Kit、QUIDEL）を用いた。

5)～7)の ELISA による測定は、キットの添付文書に従って実施した。推奨の希釈により検量線上に値が乗らない場合は、希釈倍率を変更し再検討を行い、全サンプルを同じ希釈倍率で測定した。

（倫理面への配慮）

本研究では、ヒト全血を用いることから、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会に申請を出し、承認を受けた上で実施した。試験に用いる材料として、本研究グループにおいて検討に用いている、既存の

陽性及び陰性材料と生体適合性の優れた新規材料を用い、収集する基礎データが、新規評価手法の開発にも役立つよう配慮した。

C . 研究結果

1. 純 Ti ディスクを用いた試験

純 Ti 上における CHL 細胞の増殖は、対照プレートと同様であった (図 1)。コロニー形成については、純 Ti 上で観察されたコロニーは、対照プレートに比べてコロニーの大きさは小さめで、数も若干少なかった (図 2)。細胞毒性試験の IC₅₀ 値は、CdSO₄ 処理では、4.5 μM (control) 及び 7.3 μM (Ti)、ZnO 処理では、14.2 μg/mL (control) 及び 15.5 μg/mL (Ti) で、対照プレートと比べて細胞毒性に大きな差はなかった (図 3)。次に、CHL 細胞を用いた小核試験により遺伝毒性について検討した結果、小核の出現頻度 (MN-total) は、未処理では 0.9% (control), 1.2% (Ti)、MMC 処理では 26.3% (control), 26.3% (Ti) で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった (表 1)。また M 期の細胞の割合 (MP)、多核細胞の割合 (Multi-N)、変形核の割合 (TF-N) も、未処理、MMC 処理で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

2. MPC プレートを用いた試験

MPC プレートに CHL, A549, RAW264.7 細胞を播種し、細胞形態、増殖について検討した。その結果、CHL 細胞では、細胞播種数時間後、幾つかの細胞同士が凝集し、その後、数十～数百個の細胞からなるスフェロイドを形成した (図 4)。スフェロイド形成後の倍加時間は対照プレートとほぼ同じであったが、対数増殖期は短く 3～4 日で定常期となった (図 5)。これに対して、A549 及び RAW264.7 細胞はスフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増殖した

(図 6, 8)。倍加時間は、A549 細胞では対照プレートの約 4 倍で (図 7)、RAW264.7 細胞では、どちらのプレートにおいても同じ程度であった (図 9)。次に、MPC プレートを用い CdSO₄、ZnO に対する細胞毒性について検討した結果を表 2 に示した。CdSO₄ に対する毒性は、CHL 及び A549 細胞で MPC プレートの方が対照プレートに比べて弱く、ZnO に対する毒性は、A549 細胞で MPC プレートの方が対照プレートに比べて強く、細胞株により、被験物質に対する感受性に差がみられた。

次に、CHL 及び A549 細胞細胞を MPC プレートで培養し、小核試験により遺伝毒性について検討した (図 10)。その結果、小核の出現頻度 (MN-total) は、CHL 細胞では、未処理 0.9% (control), 1.4% (MPC)、MMC 処理 (0.1 μg/mL, 48h) 10.4% (control), 10.1% (MPC)、A549 細胞では、未処理 2.6% (control), 3.3% (MPC)、MMC 処理 (0.1 μg/mL, 48h) 5.6% (control), 8.5% (MPC) で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった (表 3)。また、MP、Multi-N、TF-N の頻度も、未処理、MMC 処理で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

3. HEMA/MEA シートを用いた試験

1) 培地浸漬試験

6-well プレートに、5 種類の HEMA/MEA シート及び未コートシートを設置し、UV 滅菌後、PBS または MEM 培地を添加し、一晚浸漬試験を行った。翌日シートを水洗、風乾後、シート表面を SEM により観察した結果、PHEMA では、PBS、MEM 培地ともに、コートの剥離 (ポリマーが膨潤後、破裂した跡) が観察された (data not shown)。

2) 細胞播種試験

HEMA/MEA シートに CHL 細胞を播種し、一晚培養した。その結果、PHEMA で

は、コート剥離が観察され、細胞はシート上面の所々に塊になって接着し、それ以外はシートの十字部分（スピンコート跡）に接着していた。他の混合比の HEMA/MEA シートでは、対照に用いた 6-well プレートと同様に細胞が全体に接着していた（data not shown）。培地浸漬試験（一晚）の時と同様、PHEMA では、コート剥離が観察された。H75M25、H25M75、PMEA では、表面の所々にポリマーの膨潤が観察された。以上の結果より、以降の実験では、PHEMA は除外することにした。

3) 細胞増殖試験

PHEMA を除いた 4 種類の HEMA/MEA シート及び未コートシートに CHL 細胞を播種し、細胞増殖試験を行った。CHL 細胞液はシート中心部に播種し、細胞がシートの端から 6-well プレートにできるだけこぼれないよう、プレートを 30 分間クリーンベンチ内で静置してから CO₂ インキュベーターに移した。細胞増殖は、いずれの混合比においても、対照の 6-well プレート上と同じ程度であった（図 11）。細胞は、播種したシート中心付近で 2-3 日目に既に密になっており、周辺部に増殖が広がっていった。6-well プレート端にシートからこぼれた細胞は 5 - 10%程度で、そのままプレートの端周辺で増殖していた。

4. 血液適合性試験の予備試験

平成 25 年度は、血液適合性試験について、各評価項目の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うため、試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行い、次に高分子材料に対して、実際に血液適合性試験を実施した。予備試験では、PET、PC（未コート）、PHEMA、PMEA、MPC シートについて血液適合性試験を実施し、0 時間（シートなし）及び 2 時間インキュベ

ーション後のサンプルに対して、溶血性試験、血液凝固系の評価項目として TAT の測定、血小板活性化の評価項目として β -TG の測定、補体系の評価項目として、C3a、C5a 及び SC5b-9 の測定を行なった。予備試験の結果、被験シートを用いて血液適合性試験の各試験項目測定が可能であることが分かったので、サンプル数を増やして血液適合性試験を実施した。

5. PC シートを用いた血液適合性試験法についての検討

平成 26 年度は、陽性対照として PC シートを用い、インキュベーション時の基礎的な実験条件について検討を行なった。インキュベーションチューブの素材は、Polyethylene terephthalate（PET）、polypropylene（PP）及び PP-low protein bind tube について比較した。インキュベーション時間は、1、2、4 時間について検討した。0 時間（シート無し）及び各時間インキュベーション後のサンプルに対して、溶血性試験、TAT、 β -TG、SC5b-9 を測定した。いずれのシートも溶血率は 2%以下であり、溶血性なしと判定された（data not shown）。TAT では、PET、PP-low bind チューブを用いた際に、インキュベーション時間に応じた値の増加が観察された（図 15）。いずれのチューブにおいても、シート無しと PC シート有りでは差が観察され、PP-low bind チューブでは、4 時間目においてもシート無しで、1、2 時間とほとんど値が変わらなかった。3 種類のチューブを比較すると、4 時間目では、PP チューブが、PC シート有りの値が最も高かった。 β -TG では、PET、PP、PP-low bind チューブを用いた際に、インキュベーション時間に応じた値の増加が観察された（図 16）。 β -TG は、1 時間目で、シート無しの場合でも、0 時間に比べて値の増加がいずれの

チューブにおいても観察され、PET チューブの場合には、シート無しと PC シート有りで差が殆どなかった。3 種類のチューブの結果を比較すると、4 時間目の PC シート有り値は 3 種類のチューブで同程度であったのに対して、シート無しの値は PET、PP チューブに比べて、PP-low bind チューブで低かった。SC5b-9 でも、 β -TG 同様、PET、PP、PP-low bind チューブを用いた際に、インキュベーション時間に応じた値の増加が観察された (図 17)。SC5b-9 の値は、いずれのチューブを用いた場合も、シート無しと PC シート有りで差が僅かしかなく、においては PET チューブのインキュベーション 4 時間目、PP チューブの 2、4 時間目でシート無しの方が高く、PP-low bind チューブでも 4 時間目でシート無しと PC シート有りではほぼ同じ値であった。

以上の結果より、今後の実験は、陰性対照 (シート無し) の値が低い PP low-bind チューブを用い、インキュベーション時間を 2 時間に固定することにした。補体系最終活性化産物の SC5b-9 について、シートの有無による差が観察されなかったことから、補体系の他の評価項目である C3a、C5a についても検討することにした。

6. 混合比の異なる HEMA/MEA をコートしたシートを用いた血液適合性試験

試験条件についての検討結果を踏まえ、混合比の異なる HEMA/MEA シートを用いて血液適合性試験を実施し、蛋白質マーカーを指標とする各評価項目の特性について検討した。図 18 に、HEMA/MEA シートの接触角を測定した結果を示した。その結果、PBS 浸漬後に測定した接触角が、未浸漬の場合と殆ど変化しておらず、コートが剥離していないことが確認できた。未浸漬、PBS 浸漬の場合共に、PHEMA で最も接触角が大きく、H75M25、H50M50、H25M75、

PMEA の接触角はほぼ同じであった。血液適合性試験では、0 時間 (シート無し) 及び 2 時間インキュベーション後のサンプルに対して、溶血性試験、血液凝固系の評価項目として TAT の測定、血小板活性化の評価項目として β -TG の測定、補体系の評価項目として C3a、C5a、SC5b-9 を測定した。試験は 4 回実施し、その平均を求めた。いずれのシートも溶血率は 2 % 以下であり、溶血性なしと判定された (data not shown)。TAT では、PHEMA の値が最も高く、MEA 量が添加された HEMA/MEA シートにおいては値が低かった (図 19)。PHEMA の TAT の値は、他のシートに比べて高かったが、4 回の試験でそのレベルに幅があった。 β -TG では、HEMA/MEA シートにおいて MEA 量の増加に伴うマーカー蛋白産生の減少が観察され (図 20)、H50M50 が最も低く、H75M25、PMEA が次いで低かった。また、2 時間のインキュベーション後、シート無しの場合でも β -TG の値が増加していた。C3a では、5 種類の混合比の異なる HEMA/MEA シートにおいて殆ど差が観察されなかった (図 21)。また、2 時間のインキュベーション後、シート無しの場合でも C3a の値が増加していた。C5a では、HEMA/MEA シートにおいて MEA 量の増加に伴うマーカー蛋白産生の減少が観察された (図 22)。C5a は PHEMA において、シート無し及び PC シートに対して有為な増加が観察されたが、C5a のレベルは C3a、SC5b-9 に比べると低く (1/40~1/80)、0、2 時間目のシート無しの値と、陽性対照シート、HEMA/MEA シートによる値との間の変化は少なかった。補体系の最終活性化産物である SC5b-9 では、C5a 同様、HEMA/MEA シートにおいて MEA 量の増加に伴うマーカー蛋白産生の減少が観察された (図 23)。また、2 時間のインキュベーション後、シート無しの場合でも、 β -

TG、C3a 同様、SC5b-9 の値が増加していた。補体系の活性化産物 C3a、C5a、SC5b-9 において、陽性対照シート、HEMA/MEA シートにより、C5a、SC5b-9 の結果は似ていたが、C3a の結果は行なっており、同じ補体系の活性化マーカーでも異なる結果が得られることが示された。

7. 新規材料による血液適合性試験

PHEMA、PMEA、PMe3A、PEOEVE、PTHFVE をコートしたシートを用いて血液適合性試験を行い、溶血性試験、血液凝固系 TAT 及び血小板活性化 β -TG を測定した。試験は 4 回実施し、その平均を求めた。いずれのシートも溶血率は 2% 以下であり、溶血性なしと判定された (data not shown)。TAT の値は、PET、PHEMA、PC、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE の順に値が小さくなっていった (図 24)。 β -TG の値は、PC、PET、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE の順で (図 25) 陽性対照のシート以外の 5 種類のシートの結果は、TAT、 β -TG 共に、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE の順で、PMe3A と PTHFVE、PMEA と PEOEVE の値は同程度であった。

D. 考察

1. 純 Ti ディスクを用いた試験

純 Ti ディスクを用いて細胞の増殖について検討した結果、純 Ti 上の CHL 細胞のコロニー形成は、対照プレートに比べて、コロニーの大きさは小さめで、数も若干少なかったが、細胞増殖試験においては、両者における増殖曲線はほぼ同様であった。このことから純 Ti 上では、細胞密度が低い場合には、細胞増殖サイクルへの進行が遅れる可能性が示唆されたが、細胞密度がある程度以上であれば、細胞増殖の速度は、純 Ti 上においても培養プレートと同程度

であると考えられた。CdSO₄、ZnO に対する細胞毒性を検討した結果、IC₅₀ 値は、対照プレートと差はなく、また、小核試験により遺伝毒性について検討した結果、未処理、MMC 処理いずれの場合も、対照プレートと比べて殆ど差はなかったことから、純 Ti 上で培養したことによる、細胞毒性、遺伝毒性への影響はないと考えられた。

2. MPC プレートを用いた試験

MPC プレートに CHL、A549、RAW264.7 細胞を播種し、細胞形態、増殖について検討した結果、CHL 細胞はスフェロイドを形成して増殖したが、A549 及び RAW 264.7 細胞はスフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増殖した。スフェロイドを形成した CHL 細胞の場合には、細胞播種数時間後、幾つかの細胞同士が凝集し、数日掛けて数十～数百個の細胞からなるスフェロイドまで成長し、その後スフェロイドが合体する像が観察された。そのため、初めの数日間の細胞倍加時間は対照プレートとほぼ同じであったが、対数増殖期は短く 3～4 日で定常期となった。これは、スフェロイドの成長に伴い、スフェロイドの中心部にある細胞への酸素や栄養分の供給が不十分になるためであると考えられた。これに対して、A549 及び RAW264.7 細胞では、スフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増殖したが、その倍加時間は、RAW264.7 細胞ではどちらのプレートにおいても同じ程度であったのに対して、A549 細胞では対照プレートの約 4 倍であった。RAW264.7 細胞はマクロファージ様細胞株で、活性化マクロファージになっていない通常の増殖状態においては細胞の接着性が弱く、継代の際にもトリプシン処理ではなくピペティングにより細胞を剥がすことができるほどである。そのため MPC プレート上においても、対照プレートと変

わからない倍加時間で増殖したと考えられる。それに対して、A549 細胞は接着細胞であり、A549 細胞の増殖が、細胞接着に大きく依存しているために MPC プレート上での倍加時間が遅くなったと考えられた。本研究では 3 種類の細胞を MPC プレート上で培養したが、細胞により形態、増殖がそれぞれ異なっていたのは興味深い知見であった。特に、同じ接着タイプの CHL 及び A549 細胞で増殖形態に差が生じた理由については、細胞表面の蛋白、接着因子、構造因子等が異なっているためであることが予想され、今後、他の細胞についても検討を広げ、詳細な解析を進めることにより、有用な情報が得られることが期待される。さらに、MPC プレートを用いて細胞毒性を比較した結果、細胞株により、被験物質に対する感受性に差がみられた。これは、MPC プレート上での細胞の形態、増殖の差が関わっていると考えられた。MPC プレート上で、CdSO₄、ZnO に対する毒性が異なったことは、被験物質の物性との関連が予想されるが、そのメカニズムを明らかにできれば、合成高分子等の医用材料の安全性評価の上で、有用な知見となると思われる。

3. HEMA/MEA シートを用いた細胞増殖試験

HEMA/MEA シートを用いた試験については、培地浸漬試験、細胞播種試験を実施した後、培地浸漬試験でコートの剥離（ポリマーが膨潤後、破裂した跡）が観察された PHEMA 以外の HEMA/MEA シートにより、CHL 細胞を用いて細胞増殖試験を行った。CHL 細胞液はシート中心部に播種し、細胞がシートの端から 6-well プレートにできるだけこぼれないよう、プレートを 30 分間クリーンベンチ内で静置してから CO₂ インキュベーターに移した。細

胞増殖は、いずれの混合比においても、対照の 6-well プレート上と同じ程度で、HEMA/MEA の混合比により、細胞増殖に影響はないと考えられた。

4. 血液適合性試験の予備試験

平成 25 年度より、医用材料の血液適合性に焦点絞った研究を開始した。血液適合性試験の実施において標準的な評価項目として挙げられていたもののうち、TAT、FPA、β-TG、PF4、C3a、C5a、SC5b-9 の測定には免疫検定法（ELISA）が推奨されるため、使用できる動物種が限定される。これらの項目に対する ELISA キットがヒトの臨床検査用に開発されているものが多いことから、ヒトの血液による試験系の設定が必要になる。標準的な評価項目として挙げられている因子や活性化産物が分解しやすいなど、半減期が短いことから、それぞれの測定項目に合わせたサンプリングが必要となった。図 14 に示すように、血液凝固因子測定用にはクエン酸処理、血小板因子測定用には CTAD 処理、補体系測定用には EDTA、Futhan 処理を行ったサンプルを用いて測定を行った結果、実際にこれらの処理により ELISA で検出可能で、各因子や活性化産物が分解していないことが確認でき、また、被験試料により値に差を観察することができた。

5. PC シートを用いた血液適合性試験法についての検討

陽性対照として PC シートを用い、インキュベーション時の基礎的な実験条件について検討を行なった。インキュベーションチューブの素材は、PET、PP 及び PP-low protein bind tube について比較し、インキュベーション時間は、1、2、4 時間について検討した。その結果、PP low-bind チューブを用いることにより、陰性対照（シート

無し)の値が低く、陽性対照シートとの差が観察しやすいと考えられた。また、インキュベーション時間については2時間が適当であると考えられた。補体系最終活性化産物のSC5b-9については、シートの有無による差が観察されなかったことから、補体系の他の評価項目であるC3a、C5aについても検討することにした。

6. 混合比の異なる HEMA/MEA をコートしたシートを用いた血液適合性試験

混合比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体をコートしたシートを用いて血液適合性試験を実施し、溶血性及び、TAT、 β -TG、C3a、C5a、SC5b-9の各マーカー量を測定した結果、TAT、 β -TG、C5a、SC5b-9では、HEMA/MEAシートにおけるMEA量の増加に伴って、マーカー量の減少が観察され、図6に示した各シートの接触角の結果とも良く相関していた。これら結果は、MEAがHEMAに比べてより血液適合性に優れているという性質と一致していた。TAT、 β -TGでは、陰性対照(シート無し)に比べて、陽性対照シート(PET、PC)におけるマーカー量の増加が観察されていた。補体系マーカー(C3a、C5a、SC5b-9)に関しては、陰性対照(シート無し)に比べて、陽性対照シート(PET、PC)で値の差が殆どなく、HEMA/MEAシートとの差も観察され難かった。以上より、高分子材料の血液適合性の評価においては、TAT、 β -TG活性を指標とするのが適している可能性が示唆された。

β -TGの測定結果では、HEMA/MEAシートにおいて、H50M50、H25M75はPMEAに比べて β -TG量が減少していたことから、混合比を変化させることにより、生体適合性/血液適合性を更に向上できる可能性が考えられた。各材料の特性により、血液適合性における生体応答への影響が異

なると考えられることから、メカニズムを踏まえた解析が期待される。

7. 新規材料による血液適合性試験

本年度の研究で用いた、新規材料PMe3A、PEOEVE、PTHFVEは、いずれもPMEAの類似体である。PMe3Aは、2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl acrylateとn-butyl acrylateの共重合体(30:70 mol%)で、PEOEVE、PTHFVEは共に、PMEAのエステル部分がエーテルになったvinyl ether構造を有している。PMe3A、PEOEVE、PTHFVEに対して血液適合性試験を実施し、TAT及び β -TGの活性化について検討したところ、両マーカー共に、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVEの順に小さくなっており、PMe3AとPTHFVE、PMEAとPEOEVEの値は同程度であった。本試験の結果から推測される、血液適合性はPEOEVE = PMEA > PTHFVE > PMe3A > PHEMAの順である。PMEAとPEOEVEが同程度に低いという結果は、PEOEVEにおいてPMEA同様、中間水が観察され、PMEAとPEOEVEの血小板粘着量は同程度に低いという、H25年度の本研究班の田中らの報告と、良く一致した。

平成26年度の研究において、補体系のC3a、C5a、SC5b-9においてHEMA/MEAシートに対する挙動が異なっていたが、血液凝固の標準的な評価項目としてはTATの他にFPA、血小板においては β -TGの他にPF4も挙げられており、これらの項目が同程度に評価されるか確認しておく必要があると思われる。また、先に補体系による評価について述べたが、今回実施したin vitro評価系では、15 mLのチューブに被験シートと血液6 mLを入れ、緩やかに振盪しており、インキュベーション中、血液は空気と接触している。 β -TG及び補体系マ

ーカーC3a、C5a、SC5b-9は、2時間のインキュベーション後、いずれもシート無しにおいて、値が上昇していた。シート無しにおいて値が上昇していても、それをバックグラウンドとして被験材料による差をみる事ができれば問題ないと思われるが、今回用いた、陽性対照シート、HEMA/MEAシートでは、その差として検出することは困難で、 β -TGでは、被験シートによる値が、シート無しに比べて低い場合もあった。これらの結果が、空気との接触によるものであるかは判断できないが可能性の一つとして考えられるため、空気相の影響等についての検討も含め、今後更に、各試験法の特長、妥当性について総合的に検証に向けて、基礎的データを収集する必要があると考えられる。

本研究班においては、プロテオミクス解析を利用して、材料表面吸着蛋白質を指標とした新規血液適合性マーカーの探索が進められ、幾つかの候補蛋白質が見つかりきている。これらの材料側からの評価マーカーが、*in vitro*の血液適合性試験において、血液側からも追跡できれば、評価法の効率化、新規評価手法開発に繋がる事が期待できる。

E. 結論

平成24年度研究においては、チタン系金属、合成高分子材料を培養基質として、様々な培養細胞株を用い、細胞の増殖、コロニー形成、細胞毒性、遺伝毒性等に及ぼす影響について基礎的な検討を行った。

1) 純Tiディスク

CHL細胞を用いて、細胞増殖、細胞毒性及び遺伝毒性について検討した結果、細胞増殖は、対照プレートと同様であった。コロニー形成については、純Ti上では対照プレートに比べてコロニーの大きさが小さく、数も若干少なかった。CdSO₄、ZnO

に対する細胞毒性を検討した結果、対照プレートと比べて細胞毒性に大きな差はなかった。小核試験により遺伝毒性について検討した結果、未処理、MMC処理いずれの場合も、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

2) MPC ポリマープレート

CHL, A549, RAW264.7細胞を用いて、細胞増殖、細胞毒性及び遺伝毒性について検討した結果、CHL細胞はスフェロイドを形成し、倍加時間は対照プレートとほぼ同じであったが、対数増殖期は短く3~4日で定常期となった。これに対して、A549及びRAW264.7細胞はスフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増殖した。倍加時間は、RAW264.7細胞では、どちらのプレートにおいても同じ程度であったが、A549細胞では対照プレートの約4倍であった。CdSO₄、ZnOに対する細胞毒性について検討したところ、CHL及びA549細胞では、CdSO₄の毒性はMPCプレートの方が対照プレートに比べて弱く、RAW264.7細胞では、両プレート間で大きな違いはなかった。ZnOに対する毒性は、A549及びRAW264.7細胞でMPCプレートの方が強く、A549細胞では24時間目、RAW264.7細胞では6時間目に、毒性の差が顕著に観察された。CHL, A549細胞において小核試験により遺伝毒性について検討した結果、未処理、MMC処理いずれの場合も、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

3) HEMA/MEA シート

HEMA/MEAシート(PHEMAを除く4種類の混合比及び未コートシート)に対するCHL細胞増殖試験を行った結果、細胞増殖は、いずれの混合比、未処理シートにおいても、対照の6-wellプレートと差がなく、HEMA/MEAの混合比により細胞増殖に影響はないと考えられた。

平成 25、26 年度研究においては、血液適合性試験の各評価項目の特性及び妥当性に対する総合的な検証を行うため、試験法についての調査、試験実施方法の確認作業を行い、生体適合性の異なる高分子材料を用いて血液適合性試験を実施し、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集した。

1) PC シートを用いた血液適合性試験法についての検討

陽性対照 PC シートを用いて血液適合性試験を実施し、TAT、 β -TG、SC5b-9 の各マーカー蛋白質量を測定した結果、インキュベーション時間に依りて、TAT、 β -TG、SC5b-9 量の増加が観察された。TAT、 β -TG では PC シートの共存により、マーカー蛋白質量の増加が観察された。

2) 混合比の異なる HEMA/MEA をコートしたシートを用いた血液適合性試験

混合比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体をコートしたシートを用いて血液適合性試験を実施し、TAT、 β -TG、C3a、C5a、SC5b-9 の各マーカー蛋白質量を測定した結果、TAT、 β -TG、C5a、SC5b-9 では、HEMA/MEA シートにおける MEA 量の増加に伴うマーカー蛋白産生の減少が観察され、更に、TAT、 β -TG では、陽性対照シート (PET、PC) におけるマーカー蛋白産生の増加が観察された。以上より、高分子材料の血液適合性の評価においては、補体系のマーカー (C3a、C5a、SC5b-9) は適さず、TAT、 β -TG を指標とするのが適している可能性が示された。

3) 新規材料による血液適合性試験

PMe3A、PEOEVE、PTHFVE をコートしたシートを用いて血液適合性試験を実施し、TAT、 β -TG の各マーカー蛋白質量を測定した結果、両マーカー共に、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE 順に

値が小さくなっており、血液適合性は PEOEVE = PME A > PTHFVE > PMe3A > PHEMA の順であると推察された。

今後も引き続き生体適合性の異なる高分子材料を用いて血液適合性試験を実施し、各試験法の特性、妥当性について総合的に検証を進め、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集する予定である。

本研究の遂行にあたり、血液適合性試験の実施方法についてご指導いただきました、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 毒性学研究室の新藤智子先生に感謝致します。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

- 1) Miyajima-Tabata A., Sakai K., Kato R., Matsuoka A.: Studies on cytotoxicity and genotoxicity in CHL cells cultured on MPC polymers., Eurotox 2012 (Stockholm, 2012.6)
- 2) Kubo T., Hori T., Kuroda Y., Hojyo M., Miyajima A., Sunouchi M., Anne Corlu A., Morel F., Ozawa S., Sekino Y., Ishida S.: Comparative analyses of genomic DNA methylation and gene expression in hepatic cells. 第 27 回日本薬物動態学会年会 (東京、2012.11)
- 3) 宮島敦子、加藤玲子、酒井恵子、松岡厚子: 高分子医用材料上で培養した細胞の細胞毒性および遺伝毒性、2012 バイオマテリアル学会 (仙台、2012.11)
- 4) Miyajima-Tabata A., Kato R., Sakai K., Matsuoka A.: Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (Interlaken, 2013.9)

5) 宮島敦子、加藤玲子、小森谷薫、新見伸吾：生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答、第35回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2013.11）

6) 加藤玲子、齋島由二、福井千恵、澤田留美、宮島敦子、新見伸吾：生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響（2）：タンパク質発現の網羅的解析、第35回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2013.11）

7) 加藤玲子、佐藤正人、岡田恵里、阿久津英憲、小久保舞美、河毛知子、宮島敦子、梅澤明弘、持田譲治、新見伸吾：多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響、第27回日本軟骨代謝学会（京都、2014.2）

8) Miyajima-Tabata A., Kato R., Komoriya K., Niimi S.: Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials. Eurotox 2014 (Edinburgh, 2014.9)

9) 宮島敦子、小森谷薫、田中賢、比留間瞳、加藤玲子、新見伸吾：血液適合性試験における HEMA/MEA ランダム共重合体材料に対する蛋白質マーカーの挙動について、第36回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2014.11）

10) 加藤玲子、齋島由二、福井千恵、比留間瞳、澤田留美、宮島敦子、新見伸吾：ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性マーカーの探索、第36回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2014.11）

11) Miyajima-Tabata A., Kawakami T., Komoriya K., Kato R., Niimi S., Isama K. Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells. The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Diego, 2015.3)

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

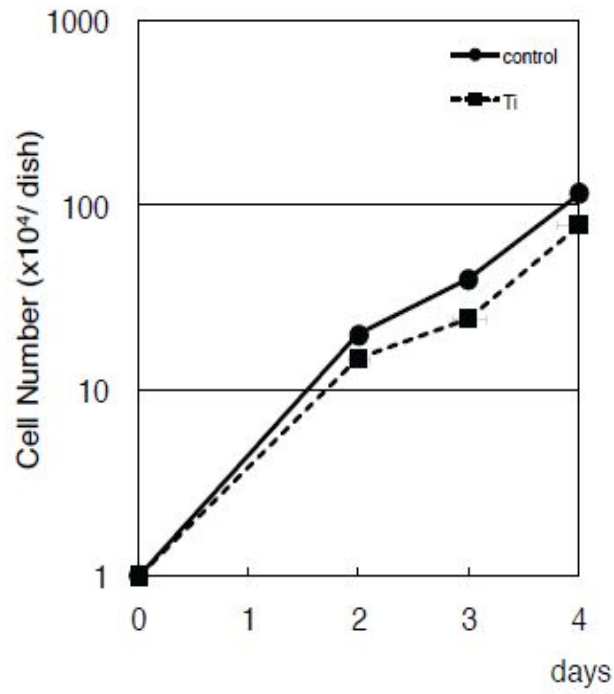


図1 Tiプレート上で培養したCHL細胞の増殖曲線

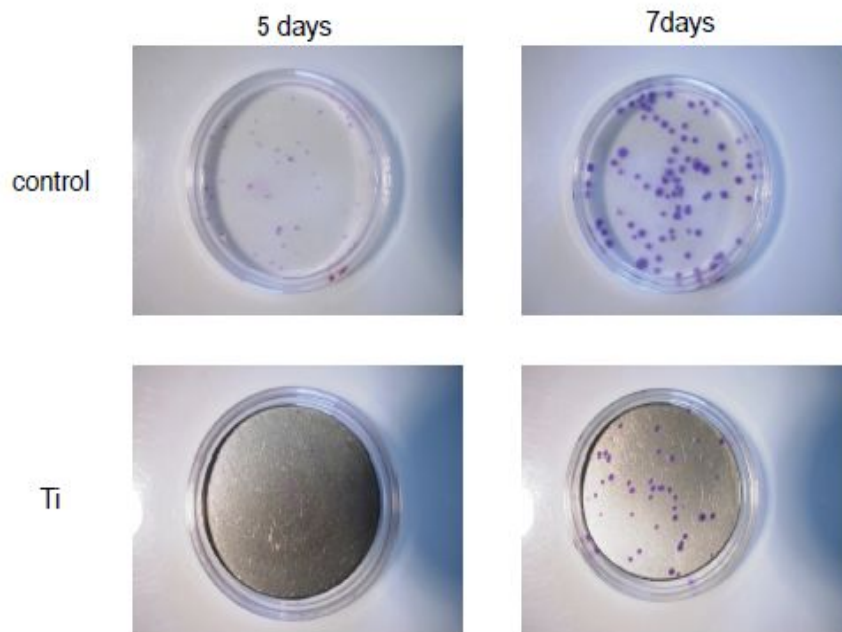
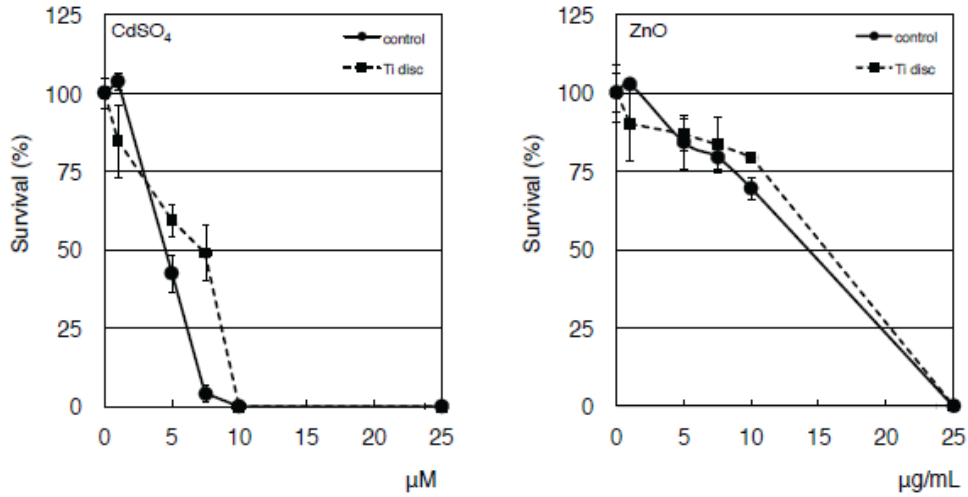


図2 Tiプレート上でのCHL細胞コロニー試験



IC₅₀ (Colony formation)
 CdSO₄: 4.5 μM (control), 7.3 μM (Ti), ZnO: 14.2 μg/mL (control), 15.5 μg/mL (Ti)

図3 Tiプレート上でのCHL細胞コロニー試験

表1 Tiプレート上でのCHL細胞小核試験

				micronucleus (%)						
		(μg/mL)		MN-2	MN-3	Multi-MN	MN-total	MP	Multi-N	TF-N
Control	48 h			0.6	0.2	0.1	0.9	3.0	0.0	0.0
Ti	48 h			0.8	0.2	0.2	1.2	2.2	0.2	0.2
Control	48 h	MMC	0.2	7.4	2.8	16.1	26.3	1.8	3.4	1.8
Ti	48 h	MMC	0.2	5.6	1.7	16.0	23.3	1.7	2.9	3.0

MN-2; 1/10-1/3 micronucleus, MN-3; 1/3-1/2 micronucleus, Multi-MN; multi micronucleus, MP; metaphase, Multi-N; multi nucleus, TF-N; transformed nucleus

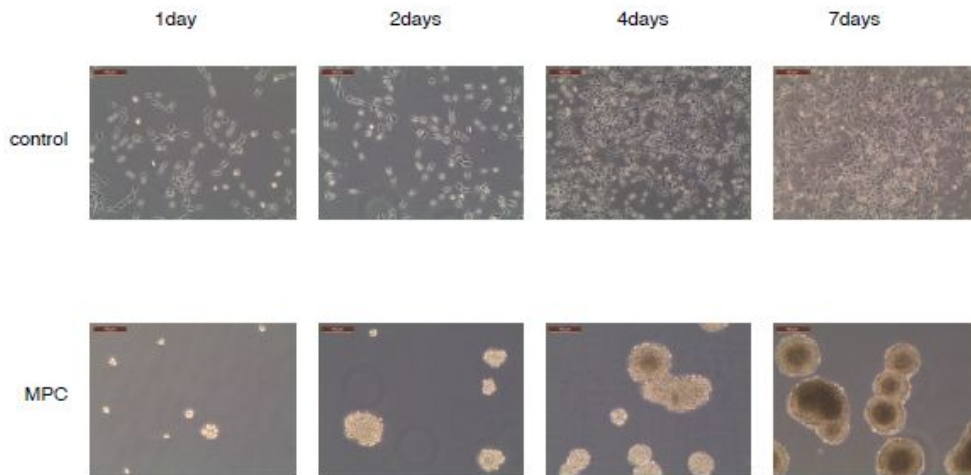


図4 MPCポリマーコートプレート上で培養したCHL細胞

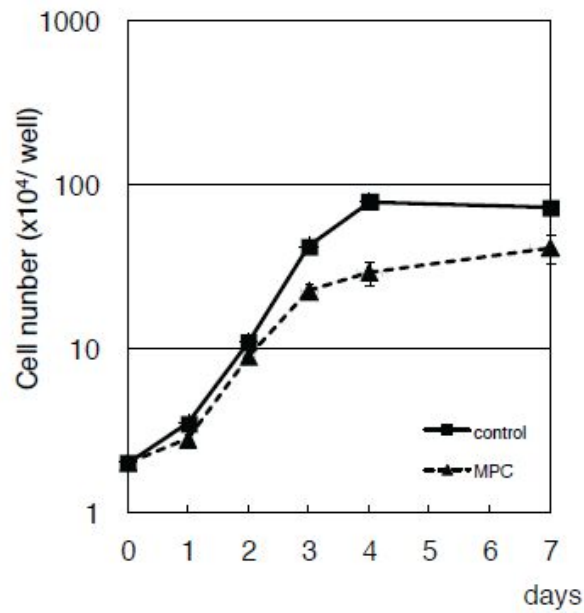


図5 MPCポリマーコートプレート上で培養したCHL細胞の増殖曲線

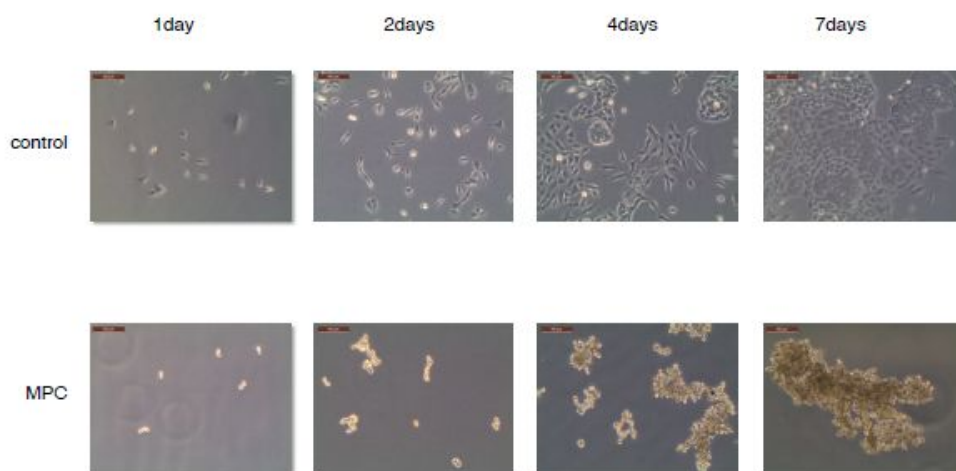


図6 MPCポリマーコートプレート上で培養したA549細胞

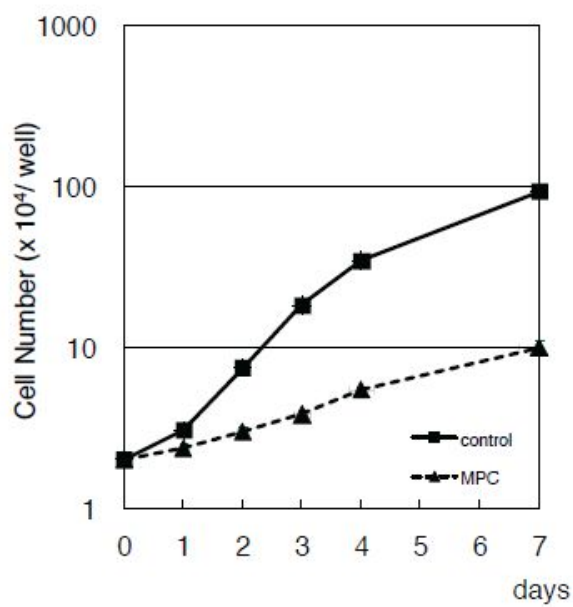


図7 MPCポリマーコートプレート上で培養したA549細胞の増殖曲線

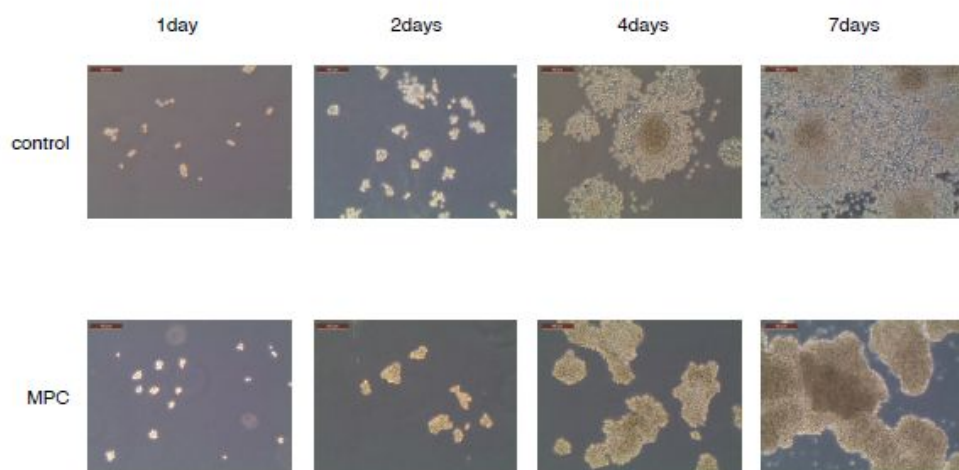


図8 MPCポリマーコートプレート上で培養したRAW264.7細胞

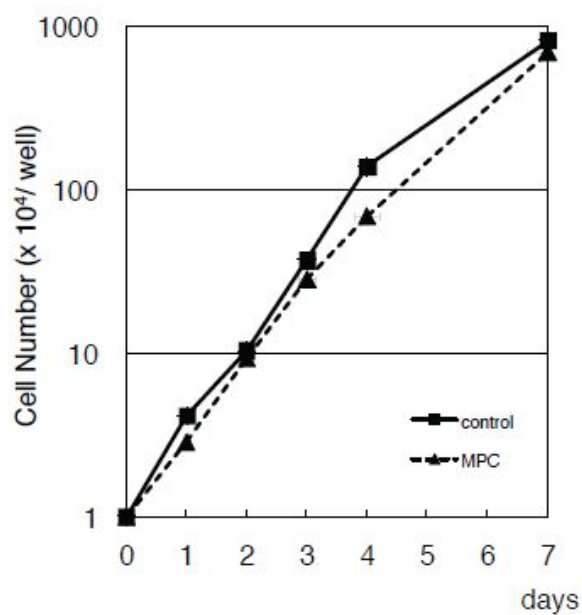


図9 MPCポリマーコートプレート上で培養したRAW264.7細胞の増殖曲線

表2 MPCポリマーコートプレート上における細胞毒性の比較

Cell line	CdSO ₄ IC ₅₀ (μ M) (24h)		ZnO IC ₅₀ (μ g/mL) (24h)	
	Control	MPC	Control	MPC
CHL	14.4	<< 44.3	16.0	< 24.3
A549	70.9	<< 96.1	31.6	>> 17.6
RAW 264.7	12.5	< 17.7	10.7	> 6.1

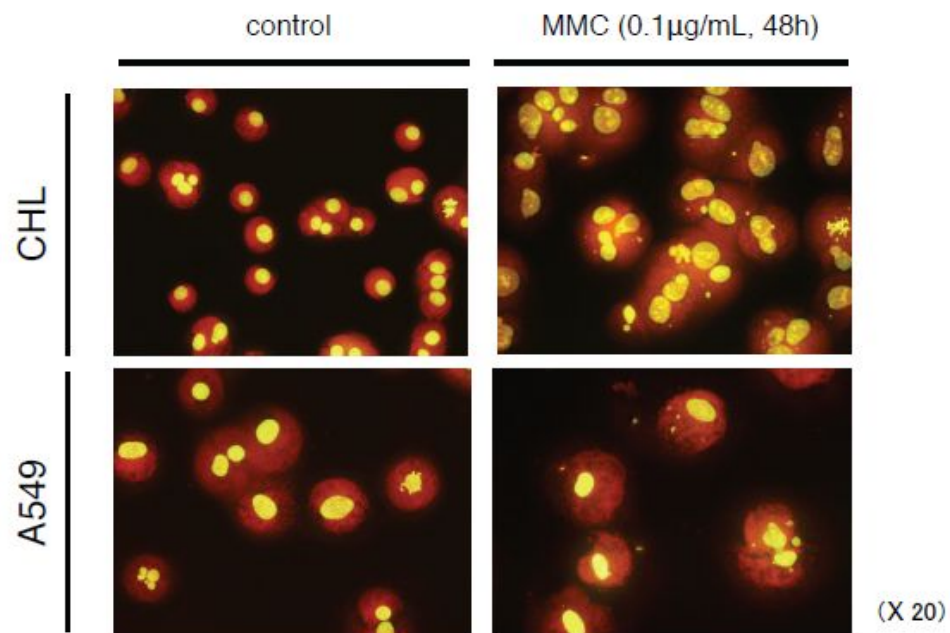


図10 CHL細胞及びA549細胞による小核試験

表3 MPCポリマーコートプレート上におけるCHL細胞及びA549細胞の小核試験の比較

Cell line				micronucleus (%)				MP	Multi-N	TF-N
				MN-2	MN-3	Multi-MN	MN-total			
CHL	Control	48 h		0.4	0.5	0.0	0.9	2.8	0	0.1
		48 h	MMC 0.02	1.9	0.5	0.3	2.7	1.3	0.1	0.3
		48 h	MMC 0.1	4.5	1.4	4.5	10.4	2.1	1.3	1.2
	MPC	48 h		0.4	0.8	0.2	1.4	1.9	0.1	0.4
		48 h	MMC 0.02	1.6	1.4	0.3	3.3	1.6	0.3	0.2
		48 h	MMC 0.1	5.0	1.0	4.1	10.1	1.6	0.9	1.6
A549	Control	48 h		0.9	0.5	1.2	2.6	1.6	0.4	1.2
		48 h	MMC 0.02	1.8	1.3	1.0	4.1	0.5	0.4	1.3
		48 h	MMC 0.1	1.6	0.7	3.3	5.6	0.4	0.6	1.6
	MPC	48 h		0.7	1.2	1.4	3.3	1.2	0.5	0.5
		48 h	MMC 0.02	1.3	1.1	2.9	5.3	0.5	0.3	2.6
		48 h	MMC 0.1	1.8	1.8	4.9	8.5	0.3	1.5	6.0

MN-2; 1/10-1/3 micronucleus, MN-3; 1/3-1/2 micronucleus, Multi-MN; multi micronucleus, MP: metaphase, Multi-N; multi nucleus, TF-N; transformed nucleus

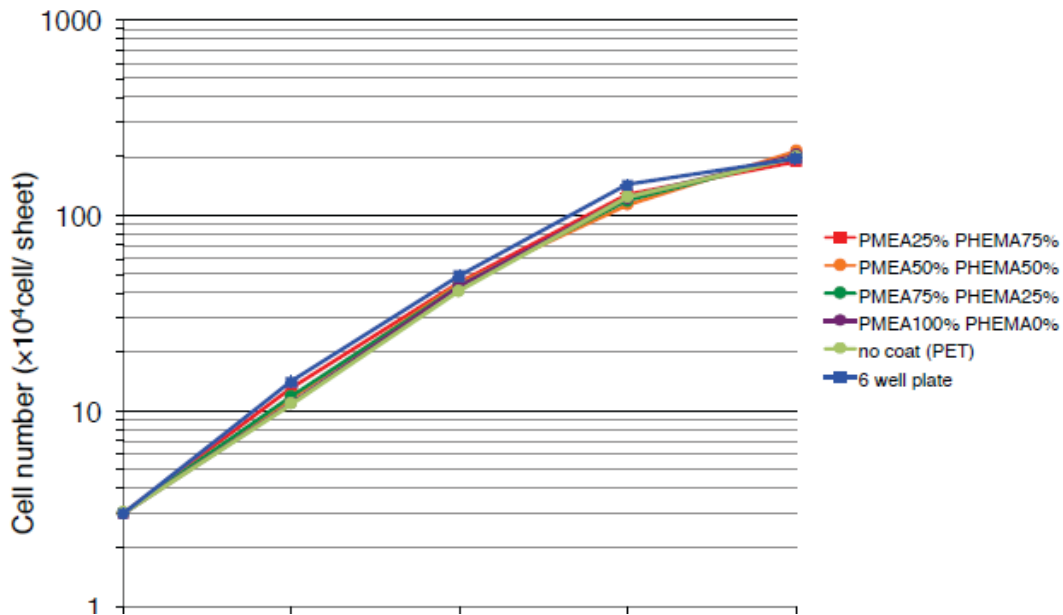


図11 HEMA/MEAコートPETシート上でのCHL細胞増殖曲線

【試験ガイドライン】

日本

●「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」
(平成15年2月13日 薬食機発0213001号 通知)

「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」

(平成15年3月19日 医療機器審査No.36 事務連絡)

引用規格: ISO 10993-4(1992), ISO/DIS 10993-4(2000), ASTM F756-93

●Biological Evaluation of Medical Devices - Part 4
Selection of Test for Interactions with Blood
ISO 10993-4, October 15, 2002
AMENDMENT 1, July 15, 2006



2009年より改訂作業中

●「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」
(平成24年3月1日 薬食機発0301第20号 通知)

引用規格: ISO 10993-4(2002)/Amd.1(2006), ASTM F756-08

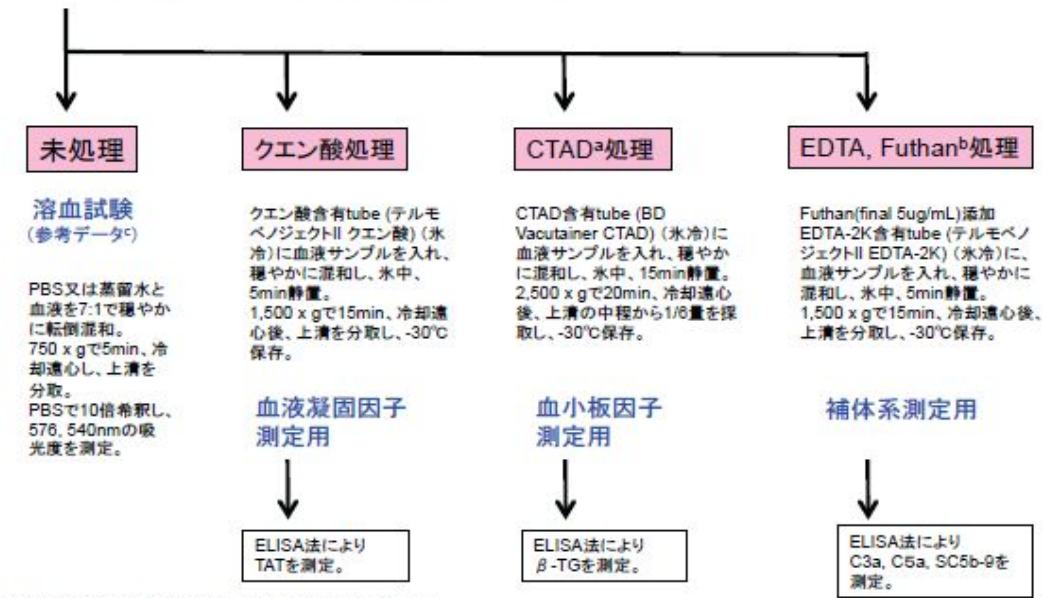
図12 血液適合性試験に関する通知

試験項目	評価項目
1 血栓形成	付着物/ 付着状態
2 血液凝固	トロンビン-抗トロンビン複合体(TAT)
	フィブリノペプチドA (FPA)
	部分トロンボプラスチン時間(PTT)
3 血小板	血小板数
	血小板放出因子(β -トロンボグロブリン(β -TG))
	血小板第4因子(PF4)
4 血液学的項目	全血算(CBC)
	溶血
5 補体系	補体活性化産物(C3a)
	補体活性化産物(C5a)
	補体活性化産物(SC5b-9)

「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」
(薬食機発0301第20号 平成24年3月1日)より

図13 血液適合性試験における標準的な評価項目

ヒト全血(ヘパリン2 U/mLを含む)と被験試料(6 cm² /1mL血液)を、37°C、2時間、緩やかに振盪(60 rpm)後、各試験項目に応じて血液をサンプリング。



^aCTAD: citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole (血小板凝集抑制)
^bFuthan: NaBismozat Mesilate (補体分解阻害剤)
^cASTM法ではクエン酸処理血、NIH法ではシチュウ酸処理血、MHLW法では脱離処理血、先に血液を希釈後、接触試験

図14 血液適合性試験の実施方法の概略

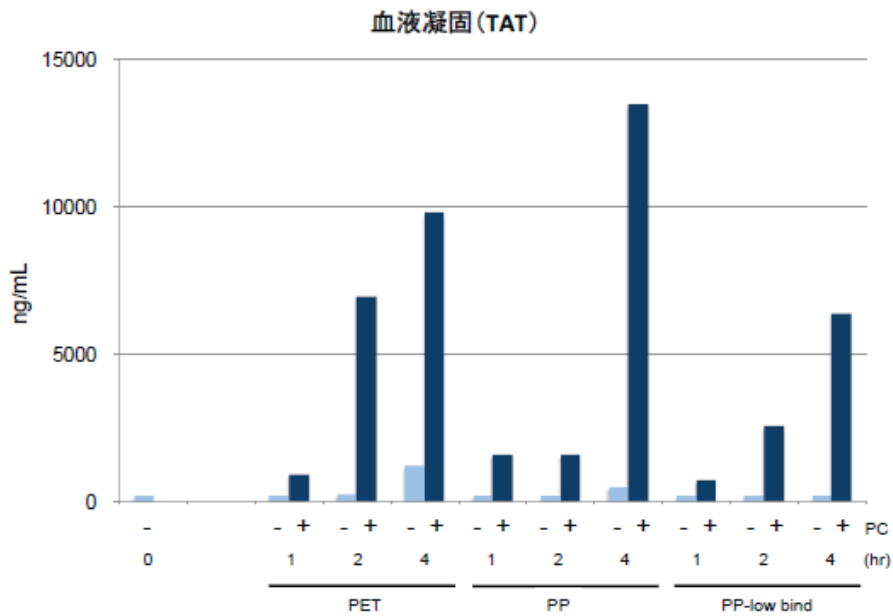


図15 血液適合性試験の試験条件の検討 血液凝固系(TAT)

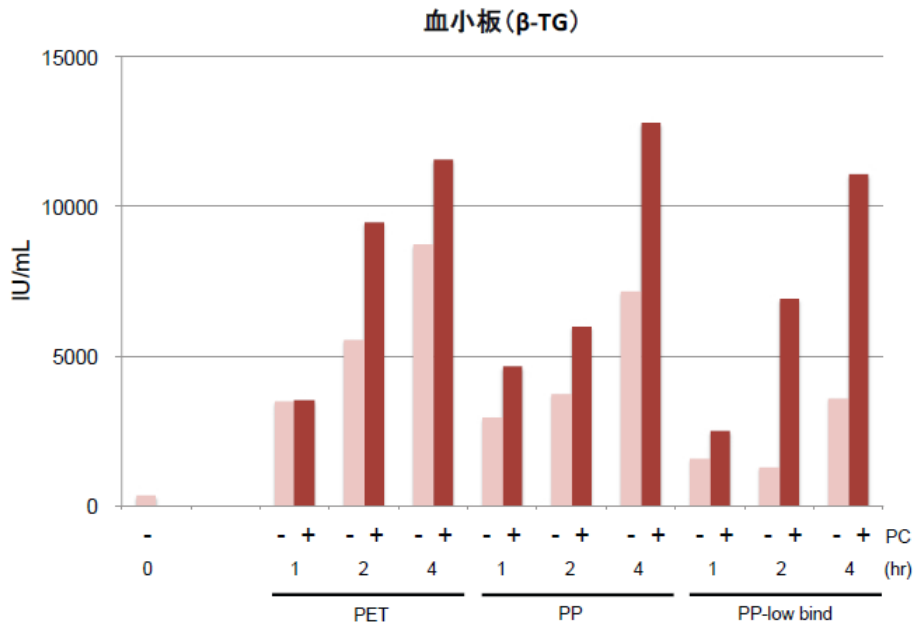


図16 血液適合性試験の試験条件の検討 血小板(β -TG)

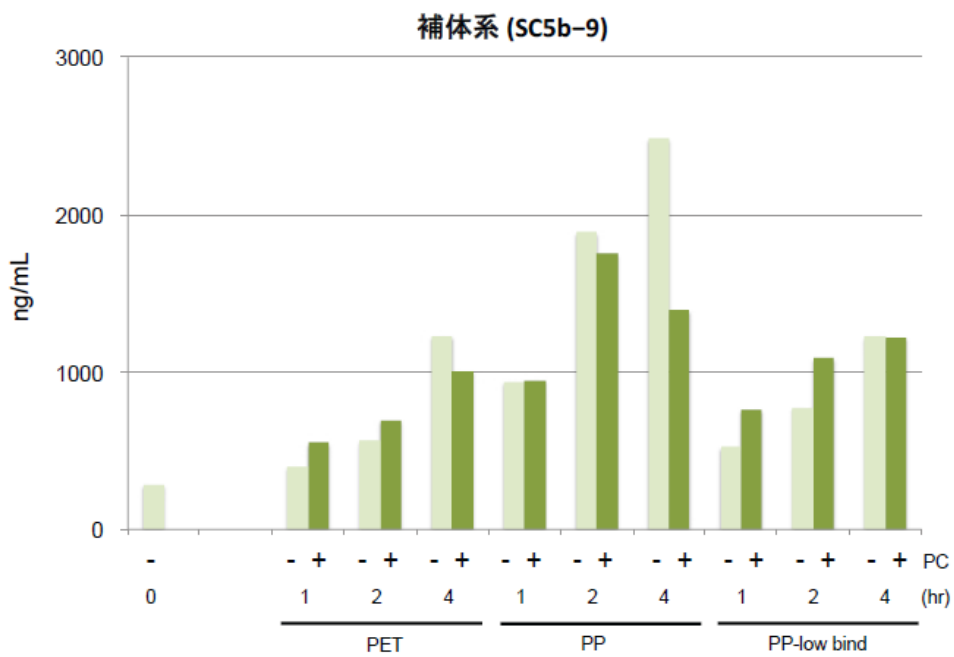


図17 血液適合性試験の試験条件の検討 補体系(SC5b-9)

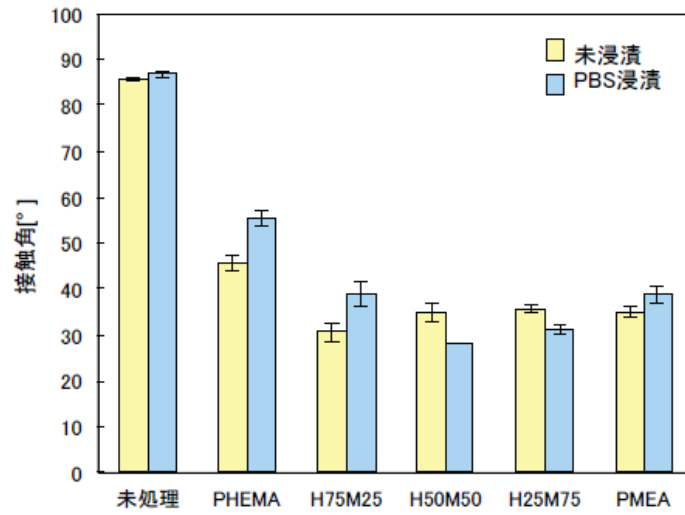


図18 混合比の異なるHEMA/MEAコポリマーコートPCシートの接触角

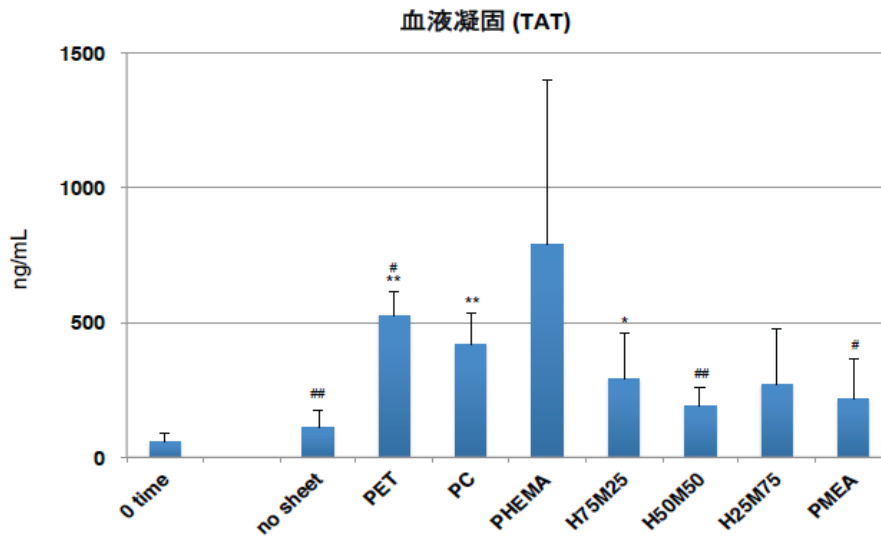


図19 混合比の異なるHEMA/MEAによる血液凝固系(TAT)の活性化

Values are expressed as mean \pm SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as *p < 0.05, **p < 0.01 and PC are shown as #p < 0.05, ##p < 0.01.

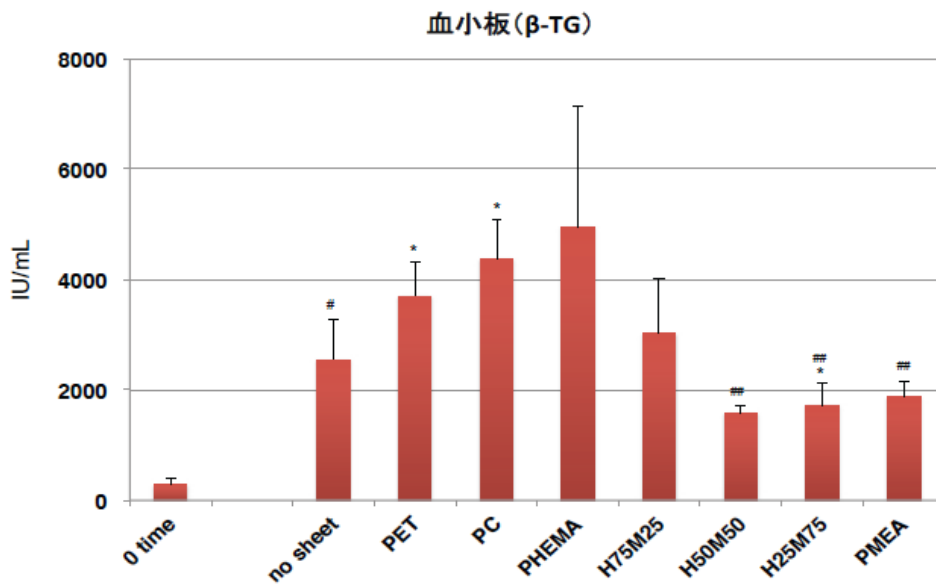


図20 混合比の異なるHEMA/MEAによる血小板(β-TG)の活性化

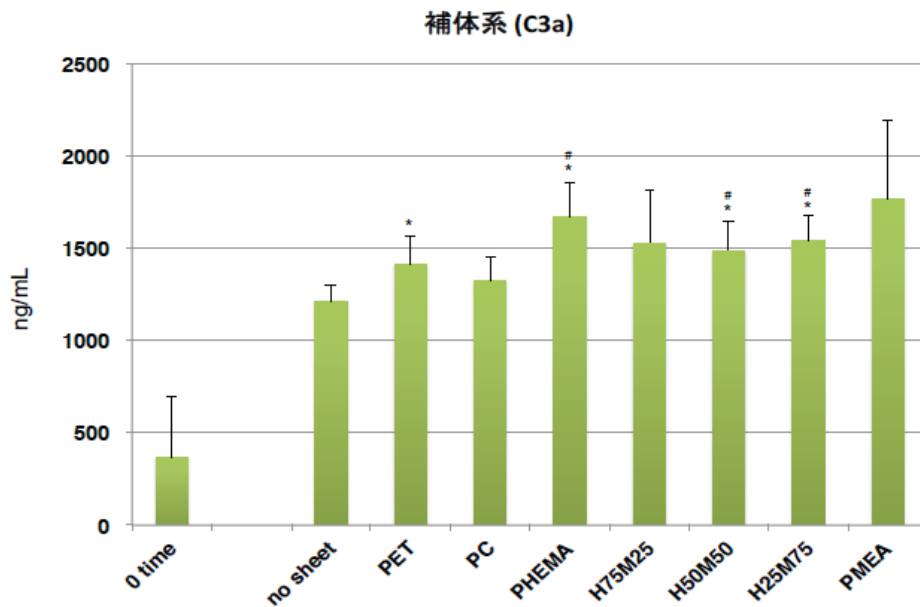


図21 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(C3a)の活性化

Values are expressed as mean \pm SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as *p < 0.05 and PC are shown as #p < 0.05, ##p < 0.01.

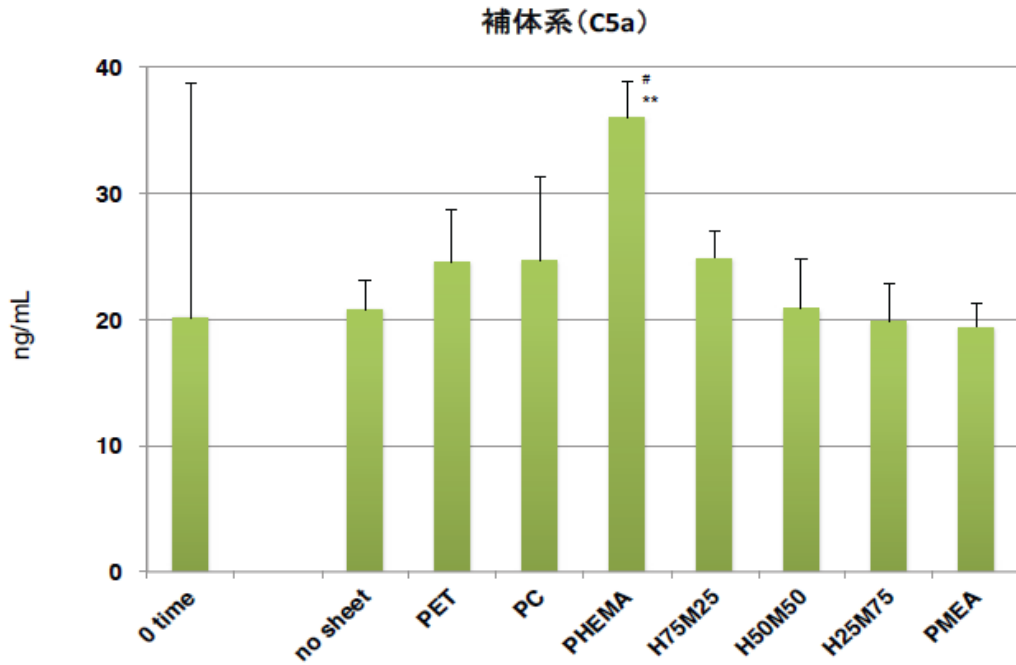


図22 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(C5a)の活性化

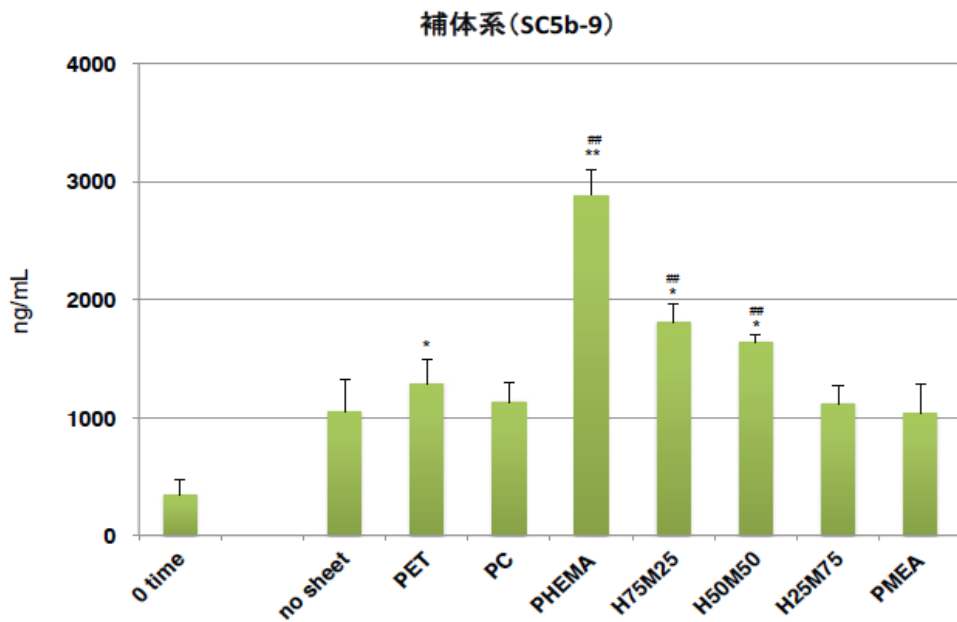


図23 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(SC5b-9)の活性化

Values are expressed as mean \pm SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as *p < 0.05, **p < 0.01 and PC are shown as #p < 0.05, ##p < 0.01.

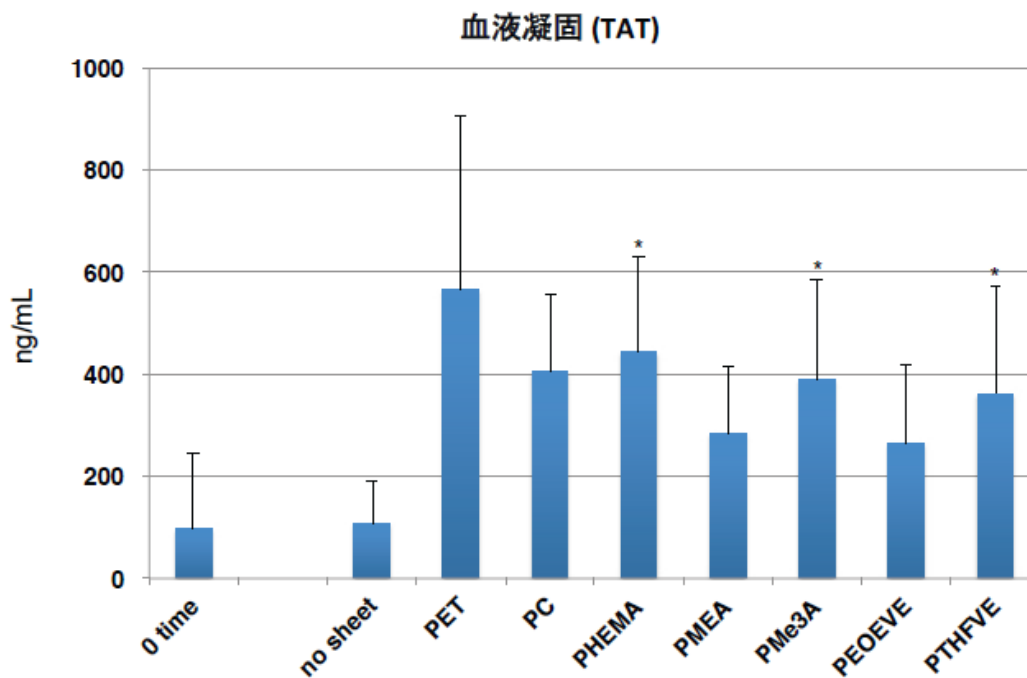


図24 新規材料による血液凝固系(TAT)の活性化評価

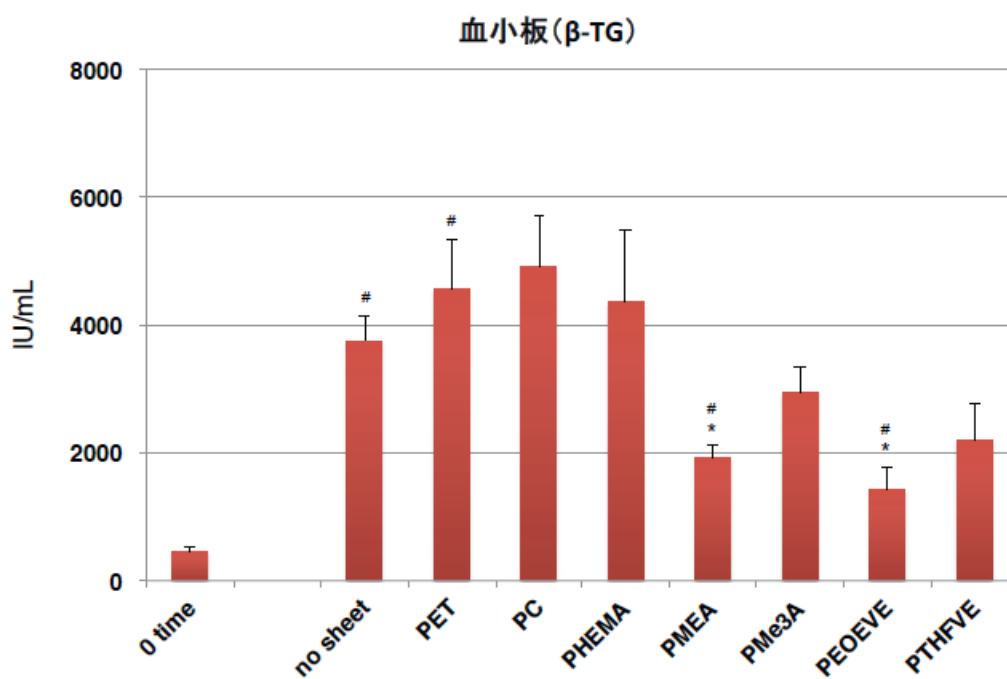


図25 新規材料による血小板(β -TG)の活性化評価

Values are expressed as mean \pm SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as * $p < 0.05$ and PC are shown as # $p < 0.05$.

分担研究報告書
厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名
細胞内タンパク質発現解析を利用した医用材料の血液適合性評価に関する研究

研究代表者	新見伸吾	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究分担者	加藤玲子	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	配島由二	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	宮島敦子	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	比留間瞳	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	小森谷薫	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部

研究要旨

近年、材料表面構造の違いが、その表面上へのタンパク質を始めとした種々の分子の吸着挙動の違いを生じさせ、その結果、細胞の接着や活性化などに影響を与えることが示唆されてきている。本研究では、材料表面構造の違いが、細胞の特性にどのような影響を与えるか、タンパク質発現の観点から検討することを目的としている。そのために、様々な生体適合高分子材料でコーティングした基材上で細胞を培養し、相互にタンパク質の発現の違いを比較しつつ、材料の生物学的特性との相関性を検討してきた。H24年度は組成比率の異なる MEA および HEMA のランダム共重合体でコーティングした表面がヒト間葉系幹細胞(hMSC)に与える影響を hMSC が産生するタンパク質網羅的発現比較解析で検討した。その結果、ランダム共重合体の組成比の違いが、コーティング表面上への吸着タンパク質の種類や量を変化させることを介して、hMSC の細胞形態や接着および細胞外マトリックスに関連するタンパク質群の発現に影響をおよぼすことが示唆された。H25年度は、検討細胞を血液球系細胞であるヒト単球細胞である THP-1 にし、PMEA および PHEMA によるコーティング表面が THP-1 細胞にどのような影響を与えるかを、THP-1 が産生するタンパク質網羅的発現比較解析にて検討した。その結果、基材を PMEA もしくは PHEMA でコーティングすることで、血液凝固だけでなく炎症反応などを制御できることが示唆された。さらに、様々な血栓性の疾患において、血液凝固と炎症反応は関連性があることが示されてきていることから、H26年度は THP-1 の活性化表面マーカー(CD54:ICAM-1, CD86: B7-2)の発現に着目して、PMEA と PHEMA に加え、新規の生体適合高分子材料である PMe3A、PTHFVE および PEOEVE でコーティングした基材上で培養した THP-1 間で比較検討を行った。その結果、培養 24 時間後では、CD86 はいずれの培養下でも対照とほとんど変化がみられなかった。CD54 の相対蛍光強度および培養上清中の IL-8 量の比較から、今回検討した生体適合高分子材料は、THP-1 の活性化に与える影響が小さい順に PHEMA > PTHFVE > PMEAE >> PEOEVE >> PMe3A であることが示された。

A. 研究目的

人工血管や人工透析膜、人工心臓やカテ

ーテルといった医療機器は、血液と接触することから血液適合性に優れていることが必要とされる。一般に、医療機器が生体内に埋植されると、直ちに材料表面にイオンや水が吸着し、そのあと生体内のタンパク質や多糖が吸着してくる。表面特性が異なれば、結合する生体分子の種類や量も異なると考えられる。一方、細胞は直接材料表面に結合するのではなく、吸着し変性したタンパク質などを介して材料と相互作用するため、材料の表面構造の違いが細胞自身の挙動に影響をおよぼし、これが生体適合性の違いを生み出す一因になると考えられる。PMEA および PHEMA は他の類似ポリマーに比べてタンパク質の吸着が少なく、生体適合性が高いことから、それぞれに様々な埋植医療機器のコーティングやソフトコンタクトレンズなどの材料として広く用いられている。その一方で PMEA は PHEMA よりも吸着タンパク質が脱離しやすく、かつタンパク質の変性が少ないことも知られている。これまでに、これらの表面へ結合するタンパク質の総量や特定のタンパク質の結合状態の違いを検討した研究はあるが、細胞に与える影響を細胞側のタンパク質発現挙動の比較から検討した報告はない。そこで本研究では、タンパク質発現挙動に焦点をおき、生体適合性高分子材料の表面構造の血液適合性を評価できるマーカー探索を試みた。H24 年度は組成比率の異なる MEA および HEMA のランダム共重合体でコーティングした表面がヒト間葉系幹細胞(hMSC)に与える影響を hMSC が産生するタンパク質網羅的発現比較解析にて、H25 年度は検討細胞を血球系の THP-1 に変えて、PMEA および PHEMA によるコーテ

ィング表面が THP-1 細胞にどのような影響を与えるかを、THP-1 が産生するタンパク質網羅的発現比較解析にて、H26 年度は THP-1 の活性化表面マーカーである CD54 (ICAM-1) と CD86 (B7-2)の発現に着目して、PMEA と PHEMA に加え、新規の生体適合高分子材料である PMe3A、PTHFVE および PEOEVE でコーティングしたシート上で培養した THP-1 間で比較検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 材料

シート(hMSC 実験): 厚さ 0.075 mm, 径 35 mm の三菱樹脂製 Pre-coated ポリエステル PET シート(ダイアホイル)(以下 PET と表記)

シート(THP-1 実験): 厚さ 0.1 mm, 径 35 mm の菅原工芸製 Pre-coated ポリカーボネートシート(ポリカーボネート 薄物)(以下 PC と表記)

ポリマー溶液: Poly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA), Poly (2-hydroxy ethyl methacrylate)(PHEMA), 組成比の異なる MEA/HEMA ランダム共重合体(混合比 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 w/w%)

Poly [2-{2-(2-methoxy-ethoxy) ethoxy} ethyl acrylate-co-butyl acrylate] (PMe3A), Poly (tetrahydrofurfuryl vinyl ether) (PTHFVE), Poly (2-ethoxy-ethyl vinyl ether) (PEOEVE)

2. ポリマーコーティングシートの作製

hMSC 実験: 1 w/v% メタノール溶液の組成比の異なる MEA/HEMA ランダム共重合体を、メタノール溶液で洗浄した未処理 PET の中央に 125 μ l 滴下し、KYOWARIKEN 製 スピンコータ (K-359SD-1 SPINNER) で以

下の3ステップ(Step1: 500 rpm, 5 sec, Step2: 2,000 rpm, 10 sec, Step3: 4,000 rpm, 5 sec)にてコーティングした後、一晚乾燥させたシートを実験に用いた。以下、作製されたシートを PMEA と PHEAM の混合比 (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 w/w%) 順にそれぞれを M100, M75H25, M50H50, M25H75 と表記する。

THP-1 実験：スピンコータの設置台上に PTFE メンブレンフィルターをのせ、その上にメタノール溶液で洗浄した未処理 PC を置き、4,000 rpm で回しながら、その中央に 1 w/v%メタノール溶液の PMEA もしくは PHEMA を 100 μ l 滴下し、4,000 rpm, 10 sec にてコーティングした後、乾燥させた後、再度同条件に計二回コーティングしたシートを実験に用いた。

3. 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC; LONZA)を 6 well, cell culture plate (TCPS; Costar)上、もしくは TCPS に各コーティングシートを静置した上に Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM; LONZA) に Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement (MSCGS; Lonza) を添加した培地 (MSCGM)を入れ、一度その培地を抜き取った後、各コーティングシート上に 1×10^5 細胞/3 ml を播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37 °C で二日間培養した。

THP-1(Human acute monocytic leukemia : 急性単核球性白血病由来)は、10%FBS/0.05mM メルカプトエタノール含有 RPMI1640 中で二週間以上、前培養したものを使用した。6 well, cell culture plate (TCPS; Costar)上、もしくは TCPS に各コーティングシートを静置した上に RPMI1640 を入れ、

一度その培地を抜き取った後、各コーティングシート上に THP-1 を 5×10^5 細胞/2 ml で播種し、5% CO₂ 雰囲気下、37 °C で一～二日間培養した。

4. 細胞形態・シート表面観察

位相差倒立顕微鏡 (LEICA DM IL; Laica) を用いて観察した。

5. 細胞タンパク質の回収

各コーティングシート上で培養した hMSC はシートごと、新しいシャーレに移し、冷 PBS で 6 回洗浄後、Cell Dissociation Buffer (Gibco)を用いて剥離した。その後、Cell Dissociation Buffer の 10 倍量以上の冷 PBS で 3 回洗浄した。一方、各コーティングシート上で培養した THP-1 は 15ml チューブに回収し、遠心した後、10 ml の冷 PBS で 1 回洗浄後、上清を捨て、1ml の冷 PBS に懸濁し 1.5ml に移し、遠心後、同じ操作を二回繰り返し、洗浄した。いずれの細胞も洗浄後、Complete Protease inhibitor Cocktail (Roche)を含む Protein Extraction Reagent type 4 (SIGMA)に溶解した。遠心分離により不溶物を除去し、2D clean-Up Kit (GE Healthcare) を用いてタンパク質を精製した後、Protein Extraction Reagent type 4 に再溶解し、2D-Quant (GE Healthcare)によりタンパク質量を測定した。得られたタンパク質試料は試験に供するまで -80 °C にて凍結保存した。

6. MS 解析用ペプチド試料の調製

上記のようにして調製したタンパク質各 40 μ g (hMSC)、10 μ g (THP-1)を常法に従って、還元 (リン酸トリブチル)、アルキル化 (ヨードアセトアミド)した。この溶液に 50 mM NH₄HCO₃ (hMSC: 86.2 μ l, THP-1:77.2 μ l)、ProteaseMax Surfactant (1%, 5 μ l; Promega)及び Trypsin Gold (1 mg/ml, 1.8 μ l;

Promega)を添加し、37 °Cで一晩インキュベーションした後、10% トリフルオロ酢酸 (TFA) 5.25 µl を加え、室温で5分間放置して反応を停止させた。得られたペプチドは OMIX Tip (C18, 100 µl: VARIAN 社)を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant)にて乾燥させた後、0.2 µg/µl の濃度になるように TFA 含有 2%アセトニトリルを加えて溶解し、LC-MS/MS 分析するまで4 °Cで保存した。

7. LC-MS/MS ショットガン解析

質量分析計は、リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計 LTQ/Orbitrap XL(Thermo Scientific)を使用し、測定前に Tyrosine-1,3,6-Standard (CS Bio Co.)を用いてチューニング及び質量校正を行った。Nano-LC としては、HTC-PAL オートサンプラー (CTC Analytics) を装備した ADVANCE NanoUPLC(AMR)を使用した。トラップカートリッジ及び分析用逆相カラムとしては、それぞれ L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 mm, 12 nm; CERI)、L-column Micro L-C18 (0.1 x 150 mm, 3 µm, 12 nm; CERI) を使用した。イオン源としては、バックグラウンド低減装置 (AMR 製 ABIRD) を装備した Captive Spray イオン源(AMR)を使用した。

試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 1.6 kV)により行った。スキャンデータ (MS スペクトル)は FT analyzer (分解能 30,000; 測定質量範囲 m/z 300-1,400; Lock mass = シロキサン及びフタル酸ジエチルヘキシル; Profile mode)により取得し、XCalibur data dependent mode により、各スキャンにおけるイオン強度の高い3種のピークを順次選択してイオントラップにより MS/MS スペクトルを測定した (CID, Normalized collision energy 35 kV, Activation

time 300 ms, Dynamic exclusion duration 60 s, Centroid mode)。測定時間は150分間とし、価数判別機能を利用して1価イオンの MS/MS スペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LC の移動相には、A 溶媒 (0.1%ギ酸)と B 溶媒 (アセトニトリル)を使用した。流速は 300 nl/min とし、サンプル注入 (1.0 µg) はオートサンプラーを使用した。一分析当たりの溶出時間は150分とし、サンプル注入後、0-40%B/125 min → 40-55%B/130 min → 100%B/135 min → 100%B/140 min → 0%B/150 min のグラジエント条件により溶出した。また、次の分析に移行する前に流路を2回洗浄した。測定の繰り返し数は n=2 とした。

分析終了後、得られた MS データに基づいて作成した Reject Mass List (8 参照)を Method File に登録し、同様の分析を更に2回繰り返すことにより、MS/MS データを取得するペプチド数を増加させた。

8. タンパク質の同定と定量

8-1. Reject Mass List の作成

LC-MS/MS 解析において得られた MS データをタンパク質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェア v1.3 (PD1.3)(Thermo Scientific)に転送し、Mascot 検索 Work Flow/UniPort/Swiss-Prot データベースを利用してタンパク質同定を行った後、同定された全てのペプチドサーチ結果を Reject Mass List に指定した。リテンションタイムトレランスは hMSC サンプルの場合: ± 1 分、THP-1 サンプルの場合は ± 5 分に設定した。

8-2. 比較定量解析

hMSC サンプル：タンパク質の多変量解析は i-RUBY ソフトウェア (メディカルプロテオスコープ) を用いて行った。LC-MS/MS 解析において得られた全ての MS データ群 (各試料 n = 2 x 2) を同ソフトウェアにインストールした後、Mascot/UniPort/Swiss-Prot データベースによるタンパク質同定、MS/MS スペクトル相同性に基づいたピークマッチングを行うことにより、タンパク質の比較定量解析を行った。

THP-1 サンプル：タンパク質の多変量解析は SIEVE2.0 ソフトウェア (Thermo Scientific) を用いて行った。LC-MS/MS 解析において得られた全ての MS データ群を同ソフトウェアにインストールし、標的イオンの m/z とリテンションタイムの相同性に基づいたピークマッチングを行い、PD1.3 により同定したタンパク質情報をインストールして、多変量解析をおこなった。

8-3. オントロジー解析とパスウェイ解析
タンパク質への機能情報付加とパスウェイ解析は Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて行った。

9. THP-1 の活性化マーカー測定 (Human Cell Line Activation Test (h-CLAT 法) の一部改変)

各コーティングシート上で培養した細胞を 24 時間後、48 時間後に 2 ml のチューブに回収し、遠心後、1 ml の冷 FACS Buffer (F.B.: 0.1% BSA 含有 PBS) に懸濁し、2 回洗浄後、600 μ l の 0.01% ヒト γ グロブリン含有 PBS に懸濁し、4 \square で 15 分間静置して FcR のブロッキングを行った。ブロッキング後、遠心して、上清を除き、120 μ l の F.B. に懸濁し、1.5 ml チューブ 3 本に 40 μ l ずつ分注し、各抗体希釈液を 10 μ l ずつ添加して、氷温上で 30 分間静置した。抗体は FITC ラベ

ルされた、1 : anti-human CD54 (clone: 6.5B5, DAKO 社) 3/5 希釈、2 : anti-human CD86 (clone: Fun-1, BD PharMingen 社) 3/10 希釈、3 : アイソタイプコントロールとして mouse IgG1 (clone: DAK-G01, DAKO 社) 3/10 希釈を使用した。抗体染色後、遠心して、上清を除き、200 μ l の F.B. に懸濁し、2 回洗浄後、400 μ l の F.B. に懸濁し、2.5 μ g/ml の PI を添加して、5 分後に Flow Cytometry (FACS Calibur Cell Quest, Becton Dickinson 社) で解析した。死細胞は Propidium Iodide (PI) によって染め分け、生細胞が 10,000 個になるまで測定した。細胞生存率は FACS で取り込んだ細胞中、PI で陰性だった割合より算出し、生存率 50% 以上のものだけ解析に用いた。

CD54 及び CD86 発現の評価法としては、以下の式に基づいた相対蛍光強度 (Relative fluorescence intensity (RFI)) を用いた。

$$\text{RFI}(\%) = (\text{各シート上で培養した細胞の MFI} - \text{各シート上で培養した細胞の isotype control の MFI}) / (\text{TCPS 上で培養した細胞の MFI} - \text{TCPS 上で培養した細胞の isotype control の MFI}) \times 100$$

MFI = Geometric Mean fluorescence intensity

h-CLAT 法における、試験対象物の陽性・陰性判定は下記の通りである。

陽性基準値 (CD54 RFI = 200, CD86 RFI = 150)

結果判定は 3 回中 2 回の試験において、CD54 もしくは CD86 のいずれかの陽性基準値を超えた場合を陽性と判定する。

10. IL-8 の測定

培養上清中の IL-8 の量は、ELISA kit Human IL-8 (invitrogen 社) を用いて、マニュアルに則して測定した。

11. 倫理面への配慮

研究に用いた hMSC は LONZA 社より、THP-1 はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入しており、倫理面の問題は無いと考えられる。

C. 研究結果

H24 年度：基材の PET シートを含む、MEA/HEMA ランダム重合体コーティングした表面上で培養した hMSC は TCPS 上で培養した場合と同様に 24 時間後には紡錘状になり、回収時の 48 時間後も同様の形状を保っており、顕微鏡観察においては形状に大きな差はみられなかった。一方、タンパク質発現比較解析においては、IPA を用いて TCPS 上の培養に対して発現量が 2 倍以上および 1/2 以下になったタンパク質が関与すると思われる生体機能検索を行ったところ、細胞の集合および組織化や細胞機能と維持に関わる機能に関連するタンパク質変動数が多かったことから、これらに関与するタンパク質群の発現挙動を検討した。細胞骨格関連タンパク質群では TCPS に比べて PET と M75H25 はほとんど変化がないのに対して、M100 はアクチン関連タンパク質だけでなく、Ena/VASP ファミリーのタンパク質である Vasodilator-stimulated phosphoprotein や Protein enabled homolog といった、細胞接着やアクチンの再構築部に会合する細胞骨格の重要な制御因子を含め全体的に発現低下がみられた。M50H50 では前述の Protein enabled homolog を含め発現上昇傾向がみられた。細胞伸展関連タンパク質群および細胞接着関連タンパク質群では、いずれも PET と M75H25 はほとんど変化がないのに対して、M100 では TCPS と

比して有意に発現が低下していた。一方、M50H50 では 2 倍以上になってはいないが、PET と M75H25 と比べると発現増加している傾向がみられた。さらに M100 が TCPS 上の培養に対して発現量の変化したタンパク質数が多かったことから、発現変化の方向から生物学的機能が亢進されるか抑制されるかの予測解析した結果、先にあげた細胞の集合および組織化や細胞機能と維持に関わる機能だけでなく細胞生存に関する機能が抑制され、細胞死に関連する機能が亢進する可能性が示唆された。そこで他の材料上でもこれらの機能に係るタンパク質の変化を確認した。細胞生存関連タンパク質群では、M100 以外の PET, M75H25 および M50H50 で、確認したタンパク質のほとんどが、TCPS と有意差がなかった。

先述のように、M100 において細胞の形態に関するタンパク質群の発現が TCPS に比して低下していたことから、細胞外マトリックスに係るタンパク質群の発現挙動に着目し比較検討したところ、M100 ではコラーゲンやフィブロネクチンだけでなく、ヒアルロン酸合成酵素およびヒアルロン酸のレセプターである CD44 を含む検討したタンパク質のほとんどが有意差ありで発現低下していた。有意差がつかないタンパク質も TCPS に比して減少傾向がみられた。M50H50 では逆にコラーゲンやフィブロネクチンなどが有意に高発現しているだけでなく、TCPS と比べて有意に発現低下しているタンパク質はなく、全体的に増加傾向がみられた。PET および M75H25 での発現はほとんど TCPS と同様の傾向であった。

一方、インテグリン自身は細胞外マトリックスではないが、細胞外マトリックスと

の相互作用を介して細胞機能を制御していることから、インテグリンの発現に着目したところ、M100 では有意に発現減少がみられた。一方、PET, M75H25 および M50H50 では、M50H50 で若干上昇傾向がみられたが、いずれも有意な増減はみられなかった。

H25年度：PMEA および PHEMA コーティングシート上に播種した THP-1 の培養 48 時間後の形態は TCPS 上で培養した THP-1 と同様にほぼ球形で浮遊していた。これに対して、未処理の PC 上で培養した THP-1 は、ほとんどが球形で浮遊していたが、一部、扁平で PC 上に接着している細胞も混在していた。タンパク質発現比較解析においては、TCPS 上で培養した THP-1 と比較して未処理の PC 上で培養した THP-1 では、補体因子・血小板凝集・血液凝固・線溶系に関連するタンパク質群のほとんどで有意に二倍以上の発現上昇がみられるのに対して、PMEA コートした上で培養した THP-1 では減少傾向、もしくは PHMEA でコートした上で培養した THP-1 では、ほとんど影響を受けていなかった。例えば、外因子系凝固反応の開始部分で働く組織因子は検出されていないが、血小板凝集の足場になるコラーゲンや、そのコラーゲンに付着し、さらに血小板をリクルートしてくる von Willebrand factor、引き続きおこる血液凝固に関与する凝固因子 V, VII の発現が PC 上で培養した THP-1 で有意に上昇が見られた。一方、トロンピンは検出されなかったが、IPA を用いたパスウェイ解析より、PC 上で培養した THP-1 では、トロンピンシグナル関連タンパク質の発現が有意に上がっていることが分かった。(図 2) これらの関連タンパク質は PHMEA でコートした上で培養

した THP-1 では、ほとんど影響を受けておらず、PMEA コートでは減少傾向がみられた。フィブリノーゲンおよびフィブリンは検出されていないが、Fibrinogen silencer_binding protein が、PC 上で培養した THP-1 で有意に発現上昇していた。凝固制御系では、アンチトロンピンやプロテイン C の発現は検出できていないが、Protein Z_dependent protease inhibitor が PC と PHEMA 上で培養した THP-1 で発現の亢進が見られた。線溶系関連タンパク質では血栓を溶かす作用のあるプラスミンとともに、その線溶阻止物質である Plasminogen activator inhibitor 1 RNA_binding protein の発現も PC で亢進していた。さらに PC 上で培養した THP-1 では、血小板活性化因子群も発現上昇がみられた。内因系凝固反応系で接触因子として働く高分子キニノゲンのレセプターコンプレックス CIQBP に含まれるケラチンタイプ II 細胞骨格 1 が PMEA および PHMEA でコートした上で培養した THP-1 で有意に発現減少していた。

また、全身の血管内で血液凝固反応が無秩序に起こる播種性血管内凝固症候群では、凝固反応の開始因子として High mobility group protein1(HMGB1)やヒストンが働くことが報告がある。これらのタンパク質は PC 上で培養した THP-1 で発現上昇が見られた。

一方、感染症時などでは、内皮細胞だけでなく、単球やマクロファージも刺激され、血液凝固開始に重要な役割を果たす組織因子を発現するようになる。このように、炎症と血液凝固の間に関連性があることから、表 4 に炎症・遊走に関連するタンパク質群の発現挙動を示した。種々のインターロイキン、インターフェロン、Tumor necrosis

factor やケモカイン関連タンパク質や Toll like receptor-3,-7,-8、アラキドン酸産生に働くホスホリパーゼ A、さらにアラキドン酸カスケードの作用で産生されるプロスタグランジン類やロイコトリエン類に関連するタンパク質、血小板凝集に働くホスホリパーゼ C などの発現も PC 上で培養した THP-1 で二倍以上の発現亢進がみられた。

さらに顕微鏡観察において、PC 上で培養していた THP-1 に形態変化が観察されたことから、細胞骨格・伸展・接着関連タンパク質群の発現挙動について検討したところ、細胞骨格タンパク質のミクロフィラメントを形成しているアクチン関連タンパク質、アクチン結合タンパク質であるフィラミン・ミオシン・トロポミオシン関連タンパク質、さらに中間系フィラメントである、ラミン、ビメンチン、微小管形成タンパク質でチューブリンおよび微小管関連タンパク質が PC 上で培養した THP-1 で二倍以上の上昇が見られた。それらのタンパク質は、TCPS 上で培養した THP-1 と比較して PMEA では減少傾向、PHEMA では、ほとんど変わらなかったが、トロポミオシン関連タンパク質で発現低下が見られた。一方、細胞の裏打ちタンパク質である、テーリン、ピンキュリン、アクチニン関連タンパク質や細胞膜貫通の細胞接着分子であるラミニン類も PC 上で培養した THP-1 で発現が亢進していた。また、血管内皮との接着に重要な LFA-1 や VLA-4 を含む種々のインテグリンの発現も PC 上で増加が見られた。

H26 年度：播種して 24 時間後では、未処理の PC で培養した THP-1 の一部に接着性の細胞が観察されたが、ほかは TCPS 上で培養した THP-1 と同様にほぼ球形で浮遊

していた。播種して 48 時間後でも未処理の PC 上で培養した THP-1 は、ほとんどが球形で浮遊していたが、中には扁平で PC 上に接着している細胞も混在していた。コーティングした PC 上で培養した THP-1 にも、若干接着している細胞が観察されたが、顕微鏡観察においては、大きな形状の変化はみられず、細胞生存率も TCPS と有意差はなかった。CD86 の発現強度は播種 24 時間後でも 48 時間後でも、陽性基準である 150 % を超えたものはなかった。一方、CD54 で陽性基準である 200 を超えたのは、播種 24 時間後において、未処理 PC で 2 回、PMEA で 1 回、PMe3A で 3 回、PTHFVE で 1 回、PEOEVE で 2 回であった。播種 48 時間後になると、未処理 PC で 3 回、PMEA で 3 回、PMe3A で 3 回、PTHFVE で 2 回、PEOEVE で 3 回であった。PHEMA は播種 24 時間後でも 48 時間後でも、1 回も 200 を超えなかった。培養上清中の IL-8 量は、培養 24 時間後および 48 時間後で TCPS と同等であったのは PHEMA のみであった。他のシートでは、24 時間後、対照と比較して、PMe3A: 約 12 倍、PEOEVE: 約 7 倍、PC: 約 4 倍、PMEA: 約 4 倍、PTHFVE: 約 3 倍であった。48 時間後も傾向は大きく変わらなかったが、さらに TCPS より高い発現がみられ、PMe3A: 約 49 倍、PEOEVE: 約 23 倍、PC: 約 10 倍、PMEA: 約 13 倍、PTHFVE: 約 8 倍であった。

D. 考察

H24 年度: TCPS 上での培養と比較して、各シートでの hMSC のタンパク質発現変化 (2 倍以上および 1/2 倍以下) を検討した結果、PET および M75H75 では、ほとんどのタンパク質で大きな変化がみられなかった。

それに対して M100 は変化があったタンパク質が 1570 個と一番多く、そのほとんどのタンパク質で発現が低下していた(1544 個)。特に細胞形態や接着および細胞生存に関して正に制御するタンパク質や細胞死を負に制御するタンパク質が低下していたことから、細胞形態や接着および細胞生存を抑制し、細胞死を亢進している可能性が示唆された。一方、411 個のタンパク質の発現変化が観察された M50H50 では、M100 とは逆に、変化したタンパク質のほとんど(372 個)で発現が高くなっており、中でも生体機能と高い関連性が示唆されたのは、細胞骨格関連タンパク質群であった。また、細胞外マトリックス関連タンパク質においてもその発現挙動が M100 では低下しているのに対して M50H50 は 2 倍以上ではなくても TCPS に比べて高い傾向がみられた。細胞外マトリックスはコラーゲン、エラスチンなどの繊維成分とプロテオグリカン、グルコサミノグリカンなどの非繊維成分、さらにこれらと細胞との接着を調節するフィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどの接着物質などからなる物質であるが、生体内では、細胞や臓器を支持したり、境界になったりする以外に、細胞の接着、細胞の分化・増殖および細胞の移動にも大きく関わっている。特にインテグリンは細胞外マトリックスとの相互作用を介して細胞死を回避し、細胞の増殖、分化、形質発現の制御を行っているタンパク質である。M100 ではインテグリンシグナルの下流に関わるタンパク質も発現低下していた。その結果、細胞形態、細胞接着、細胞の分化、増殖および細胞の移動などの機能が落ちると推測される。実際、細胞形態や細胞接着

に関わるタンパク質群の発現低下が観察されていることから、タンパク質レベルにおいて M100 では細胞形態や細胞接着機能が低下していることが示唆された。一方、HEMA が混在すると、細胞骨格や細胞外マトリックス関連タンパク質の発現は TCPS と同等か高い傾向がみられた。PHEMA 表面は PMEA 表面と比べて、タンパク質が脱離しにくく、かつ変性しやすいことが知られており、MEA に HEMA を混在させたことで、PMEA 単独に比べて、表面により多くの変性タンパク質が吸着した状態が保たれるようになり、その変性タンパク質を介して hMSC との相互作用が強くなったと推測される。実際、研究分担者薮島による組成比の異なる MEA/HEMA ランダム共重合体表面への血清タンパク質吸着挙動の解析の結果、複数のタンパク質で吸着量に違いがあることが示されている(本報告書薮島の項、研究結果(2) 吸着蛋白質の解析を参照)。また、その強度は M50H50 までは PHEMA の量に依存することが示唆された。さらにその相互作用の強さが、hMSC での細胞形態や接着および細胞外マトリックスに関連するタンパク質群の発現の調節に働いているのではないかと考えられる。

H25 年度：播種して 48 時間後の THP-1 を顕微鏡観察したところ、TCPS 上では接触面で接着はせずに物理的に触れている状態であった。しかしながら未処理の PC 上では、シートの接触面に接着している細胞や接着はしていないが突起を出している状態の細胞が一部観察された。もともと THP-1 は未刺激では浮遊している細胞であるが、ホルボールエステルやリポポリサッカロイドなどで刺激されるとマクロファージ様の細胞

に変化し接着するようになる。つまり、THP-1 は未処理の PC 表面から何らかの刺激を受けた可能性が考えられる。一方、各コーティングシート上で培養した THP-1 は TCPS と同様に接触面で触れている状態であった。これは PMEА や PHEMA コーティングにより、表面構造が変わったこと、さらに表面上への吸着タンパク質の種類や量が変化したこと（H24 年度本報告書肥島の項、研究結果(2) 吸着蛋白質の解析を参照）が影響していると考えられる。

一方、敗血症性播種性血管内凝固症候群は全身の血管内で血液凝固が起こり、その結果、微小血栓が多発する症候群である。その凝固活性化のイニシエーターとしては、病原体由来のエンドトキシン、炎症性のサイトカインや HMGB1 が考えられている。これらの因子が単球・マクロファージや血管内皮細胞の表面に組織因子を発現させ、凝固反応を開始する。このように、炎症と血液凝固との間には関連があることが知られている。THP-1 は単球系の細胞であることから、接触面の表面構造の違いによる影響から、何らかの刺激を受け炎症反応と類似した活性化状態になっている可能性が考えられた。そこで、補体因子・血小板凝集・血液凝固・線溶系および炎症・遊走・細胞骨格・伸展・接着に関連するタンパク質群に着目し、その発現挙動を TCPS 上で培養した THP-1 を対照として検討したところ、未処理の PC 上での培養で、そのほとんどのタンパク質が発現上昇（平均 3.09 倍）していた。一方、コーティングしたシート上で培養した THP-1 の上記関連タンパク質の発現は、PMEА では、減少傾向(平均 0.81 倍)がみられ、PHEMA では、ほぼ変化なかつ

た。PMEА も PHEMA もタンパク質吸着が比較的少ないが、PMEА の方が吸着タンパク質を脱離しやすく、また変性しにくいこと、さらに PMEА には中間水が存在するが、PHEMA には存在しないことが知られている。これらの性質の違いが、PMEА は TCPS に比べて減少傾向がみられているが、PHEMA はほとんど発現パターンが変わらないという、今回の結果の差に関連がある可能性がある。

H26 年度：敗血症性播種性血管内凝固症候群やアテローム血栓性疾患の発症に炎症が関わっていることが判明してきている。また、昨年度のタンパク質網羅的发現比較解析の結果、炎症関連分子の発現挙動に変化があったことから、接触面の表面構造の違いによる影響から、THP-1 が何らかの刺激を受け炎症反応と類似した活性化状態になる可能性が考えられた。一方、THP-1 を利用した、遅延型炎症性反応（感作性）を調べる *in vitro* 試験法として、国内の化粧品会社により、Human Cell Line Activation Test (h-CLAT 法)が開発されている。この方法は THP-1 の培養液中に化学物質のような被験物質を培養添加し、THP-1 の活性化マーカーである CD54 と CD86 の発現を指標として、被験物質が感作性を評価する試験法である。今回は、表面構造が THP-1 に与える影響を検討するため、ポリマー溶液自身の添加ではなく、各ポリマーでコーティングされた表面上で THP-1 を培養し、CD54 と CD86 の発現強度と、培養上清中になる IL-8 量を測定した。通常の h-CLAT では培養 24 時間後のみで判定しているが、培養条件の一部が化学物質の場合と異なるため、培養 24 時間後と 48 時間後で検討した。その結果、

CD86 は播種 24 時間後でも 48 時間後でも、陽性基準である 150 %を超えたものはなかった。一方、CD54 は播種 24 時間後において、未処理 PC、PMe3A および PEOEVE が 3 回の試験の中、2 回以上陽性基準値を超えており、h-CLAT の判定基準において陽性であると判定された。中でも PMe3A は 3 回とも、未処理 PC よりも発現強度が高かった。さらに 48 時間後では、PHEMA 以外のシートで陽性判定を満たしていた。次に、炎症性サイトカインである IL-8 の培養上清中の量を測定したところ、播種 24 時間後において、CD54 の 48 時間後の発現強度パターンと類似した産生パターンがみられ、48 時間後の IL-8 の産生量は、パターンを増強していた。このことより、タイムコースを追った確認が必要であるが、より早期の培養上清中の IL-8 の量を測定することで、CD54 の発現強度を推測できる可能性が考えられた。また CD54 発現強度測定においても、皮膚に長時間直接接する化粧品や薬剤とは異なり、これらの生体適合性高分子材料が血液に接触する医療機器に使用される際は、血液が循環している環境下であり、その中に含まれる単球などは、同じ細胞が常に接触していることはないと考えられることから、今後、培養時間について検討する必要があると思われる。

今回の結果から、1:基材である PC を含め、検討した生体適合高分子材料で CD86 の発現を顕著に上げるものはなかった。2: PHEMA の表面構造は THP-1 を活性化することはなく、他の生体適合高分子材料では THP-1 の活性化に与える影響が小さい順に PTHFVE ≥ PMEA >> PEOEVE >> PMe3A であることが示された。これは吸着タンパク

質挙動から判断した血液適合性 (H26 年度、本報告書分担研究者 薮島の項を参照) PMEA=PTHEVE>PEOEVE>PHEMA>>PMe3A とは PMEA と PHEMA の位置付けが異なるが、新規生体適合高分子材料に関しては、同様の傾向がみられている。体内で血液に触れる環境下では、血漿タンパク質だけでなく、単球を始めとした、血液細胞との相互作用もあることから、両方の結果を加味して判定を検討する必要もあると思われる。

E. 結論

H24 年度: PMEA/PHEMA ランダム共重合体の組成比の違いが、コーティング表面上への吸着タンパク質の種類や量を変化させることを介して、hMSC の細胞形態や接着および細胞外マトリックスに関連するタンパク質群の発現に影響をおよぼすことが示唆された。

H25 年度: 基材を PMEA もしくは PHEMA でコーティングすることで、血液凝固だけでなく炎症反応なども制御できる可能性が示唆された。また、その傾向は PMEA の方が強かった。

H26 年度: 今回検討した生体適合高分子材料は、THP-1 の活性化に与える影響が小さい順に PHEMA > PTHFVE > PMEA >> PEOEVE >> PMe3A であることが示された。

F. 研究発表

学会発表

1.学会発表

- 1) Miyajima-Tabata A., Sakai K., Kato R., Matsuoka a.: Studies on cytotoxicity and genotoxicity in CHL cells cultured on MPA polyers., Eurotox 2012 (Stockholm,

- 2012.6)
- 2) 2. 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 持田讓治, 松岡厚子「積層化軟骨細胞シートの同種 T 細胞におよぼす影響」 第 50 回日本人工臓器学会大会 (福岡, 2012. 11)
 - 3) 3. 宮島敦子, 加藤玲子, 酒井恵子, 松岡厚子「高分子医療材料上で培養した細胞の細胞毒性および遺伝毒性」2012 バイオマテリアル学会 (仙台, 2012. 11)
 - 4) Miyajima-Tabata A., Kato R., Sakai K., Matsuoka A.: Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (Interlaken, 2013.9)
 - 5) 澤田留美, 河野健, 加藤玲子, 新見伸吾「生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (1): 遺伝子発現の網羅的解析」 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)
 - 6) 加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾「生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (2): タンパク質発現の網羅的解析」 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)
 - 7) 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)
 - 8) 宮島敦子, 加藤玲子, 小森谷薫, 新見伸吾「生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答」 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)
 - 9) 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京, 2013.11)
 - 10) 宮島敦子, 河上強志, 加藤玲子, 酒井恵子, 小森谷薫, 新見伸吾, 伊佐間和郎. 「酸化金属ナノマテリアルの A549 細胞に対する細胞毒性および遺伝毒性」. 日本薬学会第 134 年会 (熊本, 2014.3)
 - 11) 河上強志, 宮島敦子, 小森谷薫, 加藤玲子, 伊佐間和郎. 「NiO ナノ粒子の細胞毒性に及ぼす懸濁液中の二次粒子径の影響」. 日本薬学会第 134 年会 (熊本, 2014.3)
 - 12) 宮島敦子, 河上強志, 小森谷薫, 加藤玲子, 新見伸吾, 伊佐間和郎. 「酸化金属ナノマテリアルに対する THP-1 細胞の細胞応答」. 第 41 回日本毒性学会 (神戸, 2014.7)
 - 13) Miyajima-Tabata A., Kato R., Komoriya K., Niimi S. Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials. Eurotox 2014 (Edinburgh, 2014.9)
 - 14) 加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田讓治, 新見伸吾. 「多指症組織由来細胞の免疫制御能の解析」. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 (鹿児島, 2014.10)
 - 15) 宮島敦子, 小森谷薫, 田中賢, 加藤玲子, 新見伸吾. 「血液適合性評価における HEMA/MEA ランダム共重合体材料に対する蛋白質マーカーの挙動について」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会 (東京, 2014.11)
 - 16) 加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾. 「ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカーの探索」. 第 36 回日本バイオマ

テリアル学会(東京 , 2014.11)

- 17) Miyajima-Tabata A., Kawakami T., Komoriya K., Kato R., Niimi, S. Isama K. Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells. The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Diego, 2015.3)

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

平成 24 26 年度分担総合研究報告書

「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

研究分担課題名

遺伝子発現の網羅的解析を利用した

医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験

研究分担者 澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部

研究協力者 河野 健 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部

研究要旨

純 Ti 表面の化学処理がヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の骨分化へ及ぼす影響について検討したところ、Ti 表面へのカルシウム導入処理 (CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 処理) により hMSC の骨分化へ影響を与え、Ca(OH)₂ 処理は骨分化を誘導するが、CaCl₂ 処理は限られた効果しか示さない事が判明した。さらに、Ca(OH)₂ 処理による hMSC の骨分化誘導は BMP2、Cox2、PTH1LH の誘導によって引き起こされる可能性が示唆された。また Smad シグナル伝達系とは独立した noncanonical BMP シグナル伝達系の関与も示唆された。hMSC における Wnt / -カテニンシグナル伝達経路も、カルシウムイオン導入処理により活性化され、その効果は CaCl₂ 処理よりも Ca(OH)₂ 処理の方が高かった。これは両処理間における Ti 表面へのカルシウムイオン導入量及びアパタイト形成量の違いによる可能性が示唆された。

次に、医用材料として生体親和性高分子材料であるポリ(2-メトキシエチルアクリレート)(PMEA)とポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)の2種類のポリマーに着目し、hMSC 及びヒト単球 (Human acute monocytic leukemia cell line ; THP-1) を用いて、組成比の異なる PMEA / PHEMA コポリマーのコーティング処理による細胞への影響について検討するために遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。hMSC では、生体親和性高分子材料により Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉転換) Pathway に関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった。さらに、PMEA の割合が高い方が EMT Pathway が亢進され易い可能性が示唆された。THP-1 への生体親和性高分子材料コーティング処理による遺伝子群の発現変化が疾病関連機能や生体機能に及ぼす影響について調べたところ、PMEA と PHEMA では細胞に与える影響が大きく異なることが判明した。また、生体親和性高分子材料による影響の大きさは PMEA > PHEMA > コポリマー(M25H75 > M75H25, M50H50) の順であった。

医用材料として PMEA, PHEMA に加え、3種類の類似体、ポリ[2-[2-(メトキシ

エトキシ)エトキシ]エチルアクリレート](PMe3A)、ポリ(テトラヒドロフラン-2-イルメチルビニルエーテル)(PTHFVE)、ポリ(2-エトキシエチルビニルエーテル)(PEOEVE)について、血液適合性評価の一つとして、血管内皮細胞を用いて材料における内皮化を評価するためのより最適な方法を探索した。初代培養細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と最近開発された不死化させたヒト皮膚微小血管内皮細胞のTIME-GFPを用いて、高分子材料上で培養し、細胞接着と形態及び内皮化について比較検討したところ、TIME-GFPは継代による細胞の変化もあまり見られず、またHUVECと同様の接着傾向を示し、さらに材料上でも血管内皮細胞としての機能を保持していたことから、血管内皮細胞を用いた材料の内皮化評価においてTIME-GFPを用いる有用性が示唆された。さらに、高分子材料によるTIME-GFPの機能への影響について、遺伝子発現の網羅的解析も行い、ポリマーコーティングによる内皮化の評価として、ポリマー上へのTIME-GFPの接着や増殖について検討した上で、さらに血管内皮細胞の機能への影響についても考慮する必要性が示唆された。

A. 研究目的

本研究では、医用材料と細胞との相互作用について、細胞応答の観点からの検討を目的として、生化学的・生物学的試験として遺伝子発現の網羅的解析等を中心に検討を行った。

平成24年度は、骨親和性評価を目的として、医用材料として純チタン(Ti)、細胞としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)に着目した。Ti及びTi合金は、耐食性、低アレルギー性などの優れた生体適合性を持つ事が知られ、さらに骨と直接結合するという性質を有しており、人工骨や歯根などの医用材料として広く利用されている。一方、hMSCは、多分化能と自己複製能を持ち幅広い再生医療分野での臨床研究の場ですでに利用されている。また、その採取技術及び*in vitro*での培養技術も確立されていることから、間葉系幹細胞は細胞・組織加工製品の材料として現段階で最も実用に近いものの一つであると考えられる。そこで、骨再

生医療製品等を想定した検討として、純Ti表面の化学処理がhMSCの骨分化へ及ぼす影響について検討した。まず純Ti表面へ3種類の化学処理(NaOH処理、CaCl₂処理、Ca(OH)₂処理)を行う事によって実際にhMSCの骨分化が誘導されるかどうかを確認した。さらに化学処理方法による効果の違い等の比較を行い、そのメカニズムについて探ることを目的とした。

平成25年度は、血液適合性評価を目的として、医用材料としてポリ(2-メトキシエチルアクリレート)(PMEA)とポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)の2種類のポリマーに着目した。PMEAは、細胞が異物と認識しにくい高分子ポリマーとして開発され、その優れた生体適合性から人工肺などの様々な医療機器のコーティングに利用されている。生体適合性の高さには高分子が含む中間水の量との関連性が指摘されている。PMEAにおけるこの中間水の存

在が血液適合性発現に大きく寄与していると考えられている。一方、PHEMA は中間水の存在が認められない。また PHEMA は、細胞の接着を防ぐためのコーティング剤としても利用されている。この両者について組成比を変えて共重合させた材料は、それぞれ中間水の含有率も異なり表面特性も変化する事から、細胞との相互作用にも異なる影響を及ぼすと想定される。そこで、両者の組成比の異なる PMEA / PHEMA コポリマーのコーティング処理がその表面上で培養した細胞へ与える影響について検討を行う事とし、細胞としては、hMSC に加え、血液適合性評価を行うために血球系の細胞であるヒト単球 (Human acute monocytic leukemia cell line ; THP-1) に着目し、これら 2 種類の細胞を用いてそれぞれの細胞の遺伝子発現の網羅的解析を行った。

平成 26 年度は、医用材料として、PMEA や PHEMA に加え、3 種類の類似体、ポリ[2-[2-(メトキシエトキシ)エトキシ]エチルアクリレート](PMe3A)、ポリ(テトラヒドロフラン-2-イルメチルビニルエーテル)(PTHFVE)、ポリ(2-エトキシエチルビニルエーテル)(PEOEVE)についても着目した。ステントや人工血管など生体内に留置され血液接触下で使用される医用材料の問題の一つに血栓形成があげられる。特に小口径人工血管の開存を維持するには、抗血栓性を高める必要がある。これまで、人工血管の内腔に血小板接着を抑制させる処理や、内皮化を促進させる処理などを施し、抗血栓性を高めた人工血管の開発が進められてきた。最近、PMEA は血管内皮細胞の接着も促進することが明らかとなり、人工血管の内皮化促進処理としても期待されている。材料の *in vitro* におけ

る内皮化の評価は、一般的にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) が使われているが、初代培養細胞のためロット差や培養による細胞の変化等により、同じ材料であっても常に同じ結果が出るとは限らない。最近、ATCC 社からヒト皮膚微小血管内皮細胞に human telomerase reverse transcriptase (hTERT) を導入することで不死化させた細胞 (TIME-GFP) が開発された。本研究では、*in vitro* 内皮化評価において TIME-GFP が HUVEC と代替できないか検討するために、PMEA をはじめとする生体親和性高分子をコーティング処理した基材上に、TIME-GFP または HUVEC を播種し、その形態、接着数や抗血栓性に関わる遺伝子の発現量を比較した。さらに、それぞれのコーティング処理による TIME-GFP の機能への影響について検討するために遺伝子発現の網羅的解析を行った。

B. 研究方法

1. 細胞培養

1) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 : hMSCs (Lonza) は、Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地 (MSCGM) で培養した。

2) ヒト単球 (Human acute monocytic leukemia cell line) : THP-1 (医薬基盤研究所) は、RPMI に 10% FBS と 0.05mM のメルカプトエタノールを加えた培地で培養した。

3) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells ; HUVEC) (PromoCell) は、Endothelial Cell Growth Medium 2 (PromoCell) で培養した。

4) GFP 導入不死化ヒト皮膚微小血管内皮細胞(TIME-GFP X ATCC)は Vascular Cell Basal Medium に Microvascular Endothelial Cell Growth Kit-VEGF、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blasticidin(Life Technologies)及び 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 (Clontech)を加えた培地で培養した。

2. 基材

1) 純チタン (Ti) ディスク

純 Ti のディスク (直径 33.5 mm、厚さ 2 mm、表面仕上げ : Ra=0.4 程度の研磨仕上げ ; ナカシマメディカル(株))を用いた。

2) pre-coated ポリエステルシート (ダイアホイル) (三菱樹脂(株))で厚さ 0.075mm、直径 35mm のものを用いた。

3) ポリカーボネート (PC) シート (菅原工芸) で厚さ 0.1mm、直径 33mm のものを用いた。

3. 純 Ti ディスクの表面処理

1) NaOH 処理

純 Ti ディスクをポリプロピレン製遠沈管に入れ、5mol/L の水酸化ナトリウム水溶液 (和光純薬(株))を 100mL 加えて、60 で 24 時間静置した。

2) CaCl_2 処理

NaOH 処理後の純 Ti ディスクを蒸留水 50mL で 4 回洗浄後ポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.1mol/L の塩化カルシウム水溶液を 100mL 加えて、60 で 24 時間静置した。

3) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理

NaOH 処理後の純 Ti ディスクを蒸留水 50mL で 4 回洗浄後ポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.01mol/L の水酸化カルシウム水溶液を 100mL 加えて、60 で 24 時間静置した。

4. 基材への高分子のコーティング処理

1) ポリマー溶液の調製

PMEA:PHEMA = 100:0 (PMEA) , 75:25 (M75H25) , 50:50 (M50H50) , 25:75 (M25H75) , 0:100 (PHEMA) , PMe3A, PTHFVE, PEOEVE を 1 w/v% (メタノール) に調製した。

2) ポリエステルシートへのコポリマーコーティング処理

シートをメタノールで洗浄した後、それぞれのポリマー溶液を 125 μL 滴下し、[1] 500rpm で 5 秒間、[2] 2000rpm で 10 秒間、[3] 4000rpm で 5 秒間の 3 段階でスピコートした。乾燥後、もう一度同条件でスピコートし、一晚乾燥した。

3) PC シートへのポリマーコーティング処理

シートをメタノールで洗浄した後、それぞれのポリマー溶液を 100 μL 滴下し、4000rpm で 10 秒間スピコートした。乾燥後、もう一度同条件でスピコートし、一晚乾燥した。

5. 純 Ti ディスクの表面観察とカルシウムイオン導入及びアパタイト形成

1) 材料の表面観察

化学処理を施された純 Ti 表面は、Scanning electron microscopy (SEM) にて観察した。

2) カルシウムイオン導入とアパタイト形成

材料表面へのカルシウムイオン導入量は、硝酸に溶解して Agilent 7500ce ORS ICP-MS にて測定した。

材料表面へのアパタイト形成量は、Hank's balanced salt solution (Life Technologies Co.) に 37 で 7 日間浸漬した後、硝酸に溶解し、Agilent 7500ce ORS ICP-MS にてカルシウムイオン量を測定した。

6. 表面処理をした純 Ti 上で培養した hMSC の生化学的・生物学的試験

1) 細胞培養

直径 35 mm のディッシュ(IWAKI) に 3 種類の表面処理を行った純 Ti ディスクまたは表面未処理の純 Ti ディスクを入れて、それぞれに hMSC を播種し、MSCBM に MCGS を加えた培地 (MSCGM) で培養した。培養期間中週に 2 回培地交換を行った。

2) 細胞の形態観察及び免疫染色

細胞の形態観察のために、それぞれの純 Ti ディスク上で培養した hMSC を、5 μ M CellTracker (Lonza) を添加した培地 (血清無添加の McCoy's medium) で 37、30 分間培養し、その後培地を MSCGM に取替えてさらに 30 分間培養した。培養後の細胞を PBS(-) で 1 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒドにて室温 15 分間で固定後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

Osteocalcin (OCN) のタンパク質発現を検討するために、hMSC を CellTracker で染色し、4% パラホルムアルデヒドにて室温 15 分間で固定後、ブロッキング溶液 [10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories), 0.1% Triton X-100, 0.01% NaN₃ in PBS] にて透過させた。hMSC は、一次抗体として anti-OCN 抗体 (Abcam) を用いて 4 で 16 時間、二次抗体として Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-mouse 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を用いて室温で 30 分間染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3) 細胞の増殖

表面処理を行った純 Ti ディスク上で培養した hMSC の増殖については、

TetraColor ONE (生化学工業株) を用いて検討した。

7. 生体親和性高分子でコーティングした基材上での細胞培養

1) hMSC

6 ウェルプレート (Corning) に 5 種類のコポリマーコーティングを施したポリエステルシートまたはコーティングしていないポリエステルシートを入れて、それぞれに hMSC を播種し、MSCBM に MCGS を加えた培地 (MSCGM) で 24 時間培養した。

2) THP-1

6 ウェルプレート (Corning) に 5 種類のコポリマーコーティングを施したポリカーボネートシートまたはコーティングしていないポリカーボネートシートを入れて、それぞれに THP-1 を播種し、RPMI に 10% FBS と 0.05mM のメルカプトエタノールを加えた培地で 24 時間培養した。

8. 高分子材料における血管内皮化細胞接着試験

各ポリマーでコーティングした PC シートを MPC ポリマー処理 6 ウェルプレート (Lipidure-Coat 6well plate; 日油) に入れ、 1×10^4 個の HUVEC 又は TIME-GFP を播種し、培養した。1 日及び 4 日間培養後の細胞数の測定は、細胞を PBS で洗った後、0.05% トリプシン-EDTA 溶液 (Gibco) でシートから細胞を剥離し、800 x g で 5 分間遠心分離を行った。沈殿した細胞を 100 μ l の培地で懸濁、AO/PI cell viability kit (logos biosystems) と細胞懸濁液を 1:9 の割合で混合し、Luna-FL™ 自動細胞計測装置 (logos biosystems) で細胞数を測定した。

9. Total RNA の調製

それぞれの細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を調製

した。

10. Real time (RT) -PCR による mRNA 発現量の定量的解析

抽出した total RNA の cDNA への逆転写は SuperScript III First-Strand Synthesis System for real-time polymerase chain reaction (RT-PCR; Life Technologies) を用いて行った。そして化学処理された Ti 上で培養した hMSC における Osteopontin (OPN)、OCN 及び GAPDH の mRNA 発現レベルについて、それぞれライトサイクラー専用ヒト mRNA 定量プライマーセット (Search-LC) を用いて、PCR 条件もこのキットのプロトコールに従って行った。PCR 反応は、Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を用いて Roche Light Cycler (version 4.0) で行った。

11. デジタル PCR (dPCR) による mRNA 発現量の定量的解析

培養 4 日後の HUVEC 及び TIME-GFP から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて逆転写反応を行い、cDNA へ変換した。得られた cDNA を使い Nitric oxide synthase-3 (NOS-3) 及び Thrombomodulin (TM) 発現量を dPCR (QuantStudio 3D ; applied biosystems) により定量した。NOS-3 及び TM の PCR 反応には TaqMan Gene Expression Assays (Hs01574659_m1, Hs00264901_s1 ; applied biosystems, cat. No. 431182) を用いた。内在性コントロールとして GAPDH を使い、その定量にはリアルタイム PCR (Roche LightCycler (version 4.0)) を使用した。PCR 反応はライトサイクラー専用ヒト mRNA 定量プライマーセットを用いて行

った。

12. DNA マイクロアレイ解析

それぞれの細胞から調製した total RNA を用いて、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array にて mRNA 発現を網羅的に測定した。さらに、得られたマイクロアレイデータから GeneSpring GX 12.5 (Agilent Technologies) を用いて統計学的、生物学的解析を行った。

13. パスウェイ解析

DNA アレイ解析による mRNA 発現の網羅的解析の結果から、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてパスウェイ解析を行った。

14. 有意差検定

IPA 解析における統計解析は、Fisher's Exact Test にて行った。

ポリマーコーティング処理の割合と接着細胞数についての統計解析は SigmaPlot 12.5 Software (Systat Software Inc) を用いて行った。データは一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) を行った後、各間の有意差は Student-Newman-Keuls test (SNK 検定) による多重比較で確認した。

15. 倫理面への配慮

本研究において用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞、ヒト単球、ヒト臍帯静脈内皮細胞及び GFP 導入不死化ヒト皮膚微小血管内皮細胞は全て市販品であり、倫理的問題はないと思われる。

C. 研究結果

1. 純 Ti 表面の化学処理が hMSC の骨分化へ及ぼす影響について

化学処理した純 Ti ディスクの表面観察とカルシウムイオン導入及びアパタイト形成について検討したところ、3 種類の化

学処理によって、純 Ti 表面に多孔性のネットワークが形成されている事が SEM により観察されたが、それぞれの化学処理法による違いは認められなかった。純 Ti 表面へのカルシウムイオン導入量は、未処理及び NaOH 処理では表面へのカルシウムイオン導入は認められなかったが、CaCl₂ 処理ではその両者に比べて有意にカルシウムイオンが導入され、さらに Ca(OH)₂ 処理では CaCl₂ 処理よりも有意にその導入量が増加した。純 Ti 表面へのアパタイト形成について検討するために、Ti ディスクを Hank's balanced salt 溶液に 37 °C で 7 日間浸漬した結果、3 種類全ての化学処理によりアパタイトが形成されており、その量は NaOH 処理に比べて CaCl₂ 処理の方が多く、さらに CaCl₂ 処理に比べて Ca(OH)₂ 処理の方が有意に多かった。

表面に 3 種類の化学処理を施した Ti 上で 1, 4, 7 日間培養した hMSC の形態について検討した。培養 1 日後には、化学処理したものはどれも細胞が小さくなっており、さらに CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理では丸くなっていた。培養 4 日後には、NaOH 処理及び CaCl₂ 処理では、未処理と比べて hMSC の形態に大きな差は見られなくなったが、Ca(OH)₂ 処理においては、細胞の大きさや広がりには差が見られた。培養 7 日後には、Ca(OH)₂ 処理においても他の処理群と大きな差は見られなくなった。

培養 7 日後の hMSC の細胞数を検討したところ、細胞数は未処理 > NaOH 処理 > CaCl₂ 処理 > Ca(OH)₂ 処理の順で多く、CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 処理では未処理に比べて有意に減少していた。

次に、hMSC の骨分化へ純 Ti 表面の

化学処理が及ぼす影響について検討するために、培養 7 日後の OPN と OCN の mRNA 発現を調べた。hMSC における OPN 発現は、CaCl₂ 処理で NaOH 処理と比較して有意に高かった。Ca(OH)₂ 処理では NaOH 処理及び CaCl₂ 処理と比較して有意に高く発現していた。OCN の mRNA 発現は、Ca(OH)₂ 処理において他の処理に比べて高い傾向が見られた。さらに、OCN のタンパク質発現についても検討した。hMSC 培養 28 日後の発現を観察したところ、Ca(OH)₂ 処理において OCN 発現が他の処理群と比較して有意に高かった。

次に、表面を 3 種類の化学処理を施した純 Ti ディスク上で hMSC を 7 日間培養した後 DNA マイクロアレイ解析を行い、表面未処理の純 Ti ディスク上での培養時と比較検討した。未処理と比較して化学処理によって mRNA 発現が有意に (2 倍以上) 上昇した遺伝子のうち上昇比率が高い順に 30 遺伝子をそれぞれの化学処理法について調べた。NaOH 処理によって、骨芽細胞の分化を上昇させる IL6R (interleukin 6 receptor) 及び骨芽細胞分化の過程で重要な働きを担う ITGB1 (integrin, beta 1) が、有意に上昇していた。CaCl₂ 処理または Ca(OH)₂ 処理によって、正常な骨のリモデリングに関わる SPP1 (=OPN) と MMP13 (matrix metalloproteinase 13)、また骨芽細胞の分化の促進に関わる ENPP1 (ectonucleotide pyrophosphatase) が有意に上昇していた。さらに Ca(OH)₂ 処理によって、骨芽細胞分化の際に重要な役割を担う IL6R、ITGA2 (integrin, alpha 2)、BMP2 (bone morphogenetic protein 2)、PTH1LH (parathyroid hormone-like

hormone)の有意な上昇が認められた。

また、カルシウム導入法の違いによる遺伝子発現へ影響について検討するために、CaCl₂処理とCa(OH)₂処理におけるhMSCの遺伝子発現について比較した。Ca(OH)₂処理した純Ti上で培養したhMSCにおいて、CaCl₂処理上の細胞と比較して2倍以上発現が上昇した遺伝子は94遺伝子であった(data not shown)。IPAによる解析により、その内の6遺伝子が「formation of bone (骨形成)」に関わる遺伝子と有意(p=3.96 × 10⁻⁴)に重複していた。その遺伝子は、SPP1(OPN)、PTH1H、FGF1 (fibroblast growth factor 1)、BMP2、PTGS1 (cyclooxygenase 1)、PTGS2 (cyclooxygenase 2)であった。

次に、それぞれの純Tiディスク上で培養したhMSCの骨形成や骨の発達に関わる遺伝子発現への純Ti表面の化学処理の影響について調べるために、骨再生に関連するパスウェイについて検討した。骨芽細胞における機能について、それぞれ純Ti表面の3種類の化学処理の影響について未処理のものと比較した。

まず、純Ti表面のNaOH処理の影響について、骨芽細胞の機能に関しては、骨分化におけるプロモーターであるWNT及びその細胞表面受容体Frizzled、さらにその下流のWnt/β-カテニンシグナル伝達経路の様々な構成分子を結合させる足場タンパク質であるAxinやAPC (adenomatous polyposis coli)のmRNA発現が、未処理の場合には認められなかったのに対し純Ti表面のNaOH処理によって発現が誘導された。また、RANKL (receptor activator of NF-κB ligand) decoy receptorであるOPG (osteoprotegerin)の遺伝子発現が

NaOH処理により2倍以上上昇した。次に、Ti表面のCaCl₂処理によって、Frizzled、Axin、APC及び骨分化マーカーBMPとIGF-1が誘導された。骨マトリックスタンパク質であるOPNの発現がCaCl₂処理により有意に上昇した。さらに、OPNの発現上昇に伴いintegrin 3の発現も誘導された。純Ti表面のCa(OH)₂処理の影響については、Wnt及び受容体Frizzledに加えてFrizzledの共役受容体であるLRP5/6の遺伝子発現が、純Ti表面のCa(OH)₂処理によって誘導された。また、BMP、IGF-1、integrin 3に加えて、破骨細胞分化因子であるRANKLがCa(OH)₂処理によって誘導された。さらに、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化のマーカーとなるOCNの遺伝子発現が、Ca(OH)₂処理により2倍以上上昇した。

2. 生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の機能への影響について

まず、それぞれ組成比の異なるPMEA/PHEMAコポリマーでコーティング処理された材料上でhMSCを培養した際の細胞の形態について検討した。hMSCの24時間培養後の形態は、PET及びPMEA、M75H25、M50H50、M25H75でコーティングされた材料上では、hMSCが接着していたが、PHEMAでコーティング処理された材料には細胞が接着せず、浮遊の状態が存在している様子が認められた。

次に、hMSCが接着した材料(PMEA/PHEMAコポリマー4種類とPET)上で培養したhMSCにおける遺伝子発現プロファイルについて網羅的に解析した。PETと比較し、生体親和性高分子材料によって発現が2倍以上上昇または誘導さ

れた遺伝子群について解析したところ、PMEA、M75H25、M50H50の材料によって、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉転換) Pathwayに関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった。

EMTは、TGF β 、Notch、Wnt、Receptor tyrosine kinasesによって誘導されるため、次にそれぞれのシグナル伝達について生体親和性高分子のコーティング処理による変化について検討した。TGF β が誘導するシグナル伝達経路については、PMEA、M75H25、M50H50、M25H75のどの材料についてもEMTへの経路で有意に上昇または誘導される遺伝子が多く観察され、EMTが亢進される事がわかった。Notchが誘導するシグナル伝達経路については、PMEAでのみEMTへの経路における遺伝子の発現上昇及び誘導が見られ、M75H25、M50H50、M25H75ではその傾向は認められなかった。Wntが誘導するシグナル伝達経路については、EMTへの経路における遺伝子の発現には有意な変化は認められなかった。Receptor tyrosine kinasesが誘導するシグナル伝達経路については、PMEA、M75H25、M50H50、M25H75のどの材料についてもEMTへのFGF ReceptorやEGF Receptorを介した経路で有意に上昇または誘導される遺伝子が多く観察され、EMTが亢進される事がわかった。

3. 生体親和性高分子材料によるヒト単球 (THP-1) の機能への影響について

それぞれ組成比の異なるPMEA/PHEMAコポリマーでコーティング処理された材料上でTHP-1を培養した際のTHP-1における遺伝子発現プロファイル

について網羅的に解析した。

まず、各生体親和性高分子材料がTHP-1に与える影響について、THP-1の遺伝子発現パターンによる階層的クラスタリングを行った。dishと最も類似したパターンを示したのが、M75H25及びM50H50、次いでM25H75、PHEMAの順で、PMEAが最も違うパターンを示した。次に、dishと比較して生体親和性高分子材料によって発現が2倍以上上昇または1/2以下に低下した遺伝子群の発現変化が、疾病及び生体に関わる機能に及ぼす影響について検討した。全体的な変化については、PMEAにより有意に上昇すると予想される機能が多く認められ、反対にPHEMAにより有意に低下すると予想される機能が多く認められた。一方、M75H25、M50H50、M25H75のコポリマーによる影響はあまり認められなかった。

それぞれのコーティング処理による影響についてまとめてみた。PMEA上で培養したTHP-1の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能について表2に示した。上昇すると予想される機能は42種類もあり、PMEAによる影響の大きさが伺われた。一方、有意に低下すると予想される疾病及び生体関連機能は、4種類であった。M75H25上で培養したTHP-1の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、2種類であり、低下すると予想される機能は4種類であった。M50H50上で培養したTHP-1の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、3種類であり、低下すると予想される機能は1種類だけ

であった。M25H75 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、3 種類であり、低下すると予想される機能は 2 種類であった。PHEMA 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は 11 種類であり比較的多かった。また、有意に低下すると予想される疾病及び生体関連機能は、73 種類もあり PMEA による影響の大きさが伺われた。

次に、コーティング処理による THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に変化すると予想される毒性関連機能について検討した。PHEMA 上で培養した THP-1 の遺伝子発現の有意な変化により、有意に上昇すると予想される毒性関連機能は 6 種類あり、逆に低下すると予想される機能は 2 種類であった。その他の生体親和性高分子材料上で培養した THP-1 については、有意に変化が予想される毒性関連機能は認められなかった。

4. 高分子材料上における HUVEC の細胞接着と形態及び内皮化について

各高分子をコーティング処理した PC シートに HUVEC を播種し、細胞接着及びその形態を観察した。さらに、内皮化の指標の一つとして細胞数を測定した。PC シート以外への細胞接着を防ぐために、MPC 処理を施した 6 ウェルプレートに PC シートを入れ細胞を播種した。HUVEC (Lot No. 311301) の培養 1 日後、PMEA でコーティングしたシートでは、HUVEC が接着していたが、PHEMA 及び PMEA/PHEMA のコポリマーでコーティングしたシートでは細胞が接着していなかった。PMEA で接着した細胞は、Dish と比べ接着面積が小さく、

球形であった。PTHFVE は PMEA より細胞接着数は少なかったが、形は Dish 上で培養した細胞に近く、扁平状であった。PMe3A 及び PEOEVE でコーティングしたシートでは、培養 1 日後、細胞数は検出限界以下であったが、顕微鏡観察により、球形の細胞が僅かに接着していることを確認した。未処理 (untreat) のシートも PTHFVE と同程度、細胞が接着していた。PC シートを入れていない MPC コート 6 ウェルプレートでは細胞は全く接着しておらず、シート以外の場所で接着する細胞は無視できることを確認した。

培養 4 日後、Dish 上の HUVEC は増殖しており、コンフルエントの状態であった。また、PMEA をコーティングしたシート上の細胞も増殖が認められ、ほぼコンフルエントに近い状態であったが、PHEMA 及び PMEA/PHEMA のコポリマーでコーティングしたシートでは培養 4 日後でも細胞は接着していなかった。PTHFVE は PMEA と同程度の増殖率を示していた。PMe3A 及び PEOEVE 上での細胞数は、培養 1 日後では検出限界以下であったが、培養 4 日後では検出できるまでに細胞が増殖していた。一方、未処理の PC シート上での細胞の増殖は他と比べて低かった。

HUVEC のロットによる影響を検討するために、他の 2 ロットでも同様の実験を行った。各ポリマーコーティングした PC シート上の細胞形態についてはロットによる大きな違いは見られなかった。一方、細胞数については、HUVEC (4031901.2) は PMEA と PTHFVE 上での細胞数は同程度であったが、HUVEC (4061601.1) は PTHFVE の方が PMEA よりも細胞数が多かった。また、HUVEC (4031901.2) は

培養 1 日後で PMe3A 及び PEOEVE で細胞数を測定できたが、HUVEC(4061601.1)では 1 日後に細胞が接着していたものの、培養 4 日後でも細胞数は検出限界以下であった。PHEMA 及び PMEA/PHEMA のコポリマーはいずれのロットも接着しなかった。

5. 高分子材料上における TIME-GFP の細胞接着と形態及び内皮化について

hTERT 導入により不死化させたヒト皮膚微小血管内皮細胞 (TIME-GFP) を使って、HUVEC と同様の実験を行った。各ポリマーコーティングした PC シート上の細胞形態及び接着については、HUVEC と同じ傾向を示した。独立した実験を 3 回行った結果、PMEA と PTHFVE 及び PMe3A と PEOEVE は同程度の細胞数と増殖率を示した。HUVEC 3 ロットの結果と同様に、untreat では細胞は接着するものの増殖率は低く、PHEMA 及び PMEA/PHEMA のコポリマーは接着しなかった。

6. 高分子材料上における HUVEC 及び TIME-GFP の血管内皮細胞としての機能確認

HUVEC 及び TIME-GFP が各ポリマーコーティングしたシートに接着して、血管内皮細胞としての機能を保持しているか確認するために、NOS-3 と TM の 2 遺伝子が各ポリマー上で培養した際に発現しているかどうか定量 PCR 法により調べた。Dish 上では、HUVEC と TIME-GFP は NOS-3 及び TM を同程度発現していた。また、各ポリマーコーティングしたシート上においても、Dish と比較してそれぞれ NOS-3 及び TM の発現が低下することはなかった。

7. ポリマーコーティング処理の割合と接着細胞数について

TIME-GFP の接着数を調べることで、ポリマーコーティング処理の割合をどの程度検出できるのか調べるために、面積の 100%、50%を PMEA 処理した PC シートに TIME-GFP を播種し、4 日間培養後の細胞増殖を解析した。その結果、PMEA100%と 50%及び PMEA50%と 0%の間の細胞増殖率に有意な差がみられた。

8. 高分子材料による TIME-GFP の機能への影響について 遺伝子発現の網羅的解析

TIME-GFP が接着した材料 (PMe3A, PTHFVE, PEOEVE, PMEA と未処理の PC) 上で 4 日間培養した TIME-GFP における遺伝子発現プロファイルについて網羅的に解析した。Dish 上での培養と比較して TIME-GFP の mRNA 発現が有意に変化した遺伝子数を調べた。未処理の PC 上での培養によって発現が有意に低下した遺伝子数は 308 でポリマーコーティングによって有意に変化した遺伝子数よりも比較的多めであったが、4 種類のポリマーコーティングによってそれぞれ有意に変化 (上昇または低下) した遺伝子の数は同程度であった。

次に、コーティング処理による TIME-GFP の遺伝子発現の有意な変化により、有意に変化すると予想される疾病及び生体関連機能について検討した。まず、未処理の PC では、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、“development of blood cells” など 3 種類であり、低下すると予想される機能は “metabolism of triacylglycerol” など 10 種類であった。また、遺伝子発現の有意な変化から予想される上流の制御因子の変化と “metabolism of triacylglycerol”

などの機能との関連について示した。PMe3A では、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、“ glucose metabolism disorder ”など4種類であり、低下すると予想される機能は“ differentiation of cells ”など8種類であった。また、遺伝子発現の有意な変化から予想される上流の制御因子の変化と“ differentiation of cells ”などの機能との関連について示した。PTHFVE では、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は無く、低下すると予想される機能は“ cell movement of epithelial cells ”など4種類であった。しかし、遺伝子発現の有意な変化から予想される上流の制御因子の変化等は特に認められなかった。PEOEVE では、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、“ aortic disorder ”など心血管疾患に関わる3種類であり、低下すると予想される機能は“ differentiation of epithelial cells ”など25種類であった。また、遺伝子発現の有意な変化から予想される上流の制御因子の変化と“ aortic disorder ”などの機能との関連について示した。PMEA では、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は、“ proliferation of hematopoietic progenitor cells ”など2種類であり、低下すると予想される機能は“ development of head ”など2種類であった。また、遺伝子発現の有意な変化から予想される上流の制御因子の変化と“ proliferation of hematopoietic progenitor cells ”の機能との関連について示した。

D. 考察

1. 純 Ti 表面の化学処理が hMSC の骨分化へ及ぼす影響について

Ti の表面特性は、生体適合性に大きく関わる。Ti 表面の特徴は、タンパク質の吸着や細胞-材料の相互作用に影響を与え、骨結合を制御する。本研究では、純 Ti の表面を化学処理することによってカルシウムイオンの導入や Ti 上で培養した hMSC の骨分化へ及ぼす影響について検討した。アルカリ (NaOH) 処理によって Ti 表面にチタン酸水素ナトリウムの層が形成され、化学処理した表面へのアパタイト形成が始まるが、その後 CaCl_2 処理しカルシウムイオンを表面へ導入する事によってアパタイト形成がわずかに促進したという報告があったため、本研究では Ti 表面へのカルシウムイオン導入に着目し、カルシウム導入の方法として2種類、 CaCl_2 処理と $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理とを比較した。

カルシウムイオン導入した CaCl_2 処理と $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理によって、hMSC の形態が変化し細胞数が減少した。hMSC において、細胞の形態と骨分化は関連しているとの報告もあるため、両処理によって Ti 表面にカルシウムイオンを導入する事によって hMSC の骨分化に影響を与えたと考えられる。さらに、カルシウムイオン導入量及びアパタイト形成量は CaCl_2 処理に比べて $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理の方が有意に高かった。hMSC の骨分化へ純 Ti 表面の化学処理が及ぼす影響について検討するために、骨マトリックスである OPN と骨形成マーカーの OCN の mRNA 発現及び OCN のタンパク質発現についても検討したところ、hMSC における OPN の

mRNA 発現はカルシウム導入処理 (CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 処理) によって有意に増加し、Ca(OH)₂ 処理は CaCl₂ 処理と比較して有意に高かった。OCN のタンパク質発現については、Ca(OH)₂ 処理において OCN 発現が他の処理群と比較して有意に高かったものの CaCl₂ 処理では影響は見られなかった。以上の結果から、Ti 表面へのカルシウム導入により hMSC の骨分化へ影響を与える事がわかった。また、Ca(OH)₂ 処理は骨分化を誘導するが、CaCl₂ 処理は限られた効果しか示さない事が判明した。

次に、Ti 表面へのカルシウムイオン導入による hMSC の骨分化誘導作用のメカニズムについて探るために DNA マイクロアレイ解析及びパスウェイ解析を行った。骨分化や骨代謝に関わるいくつかの遺伝子が、Ti の化学処理によって発現が有意に上昇した。IL6R や ITGB1 は NaOH 処理によって有意に上昇した (。SPP1 (OPN)、MMP13、ENPP1 は CaCl₂ 処理または Ca(OH)₂ 処理により有意に上昇した。そして Ca(OH)₂ 処理によって、ITGA2、BMP2、PTH1H が有意に上昇した。さらに 2 種類のカルシウム導入法について比較するために、CaCl₂ 処理と Ca(OH)₂ 処理とを比較したところ、CaCl₂ 処理に比べて Ca(OH)₂ 処理によって hMSC の BMP2、PTGS2 (Cox2)、PTH1H、SPP1 (OPN) の発現が有意に高かった。これまでに、ラットにおいて Cox2 の機能が骨形成に必須であり、間葉系前駆細胞において Cox2 の誘導を通して骨分化が刺激される事が報告されている。また、骨芽細胞及び間葉系細胞において BMP2 は Cox2 を誘導する。さらに細胞外のカルシウム量の増加が BMP2 の発現を上昇さ

せるという報告もある。その上、カルシウムに関わるシグナル伝達系において Cox2 による PTH の誘導が重要な役割を果たすこともわかっている。以上のことから、Ca(OH)₂ 処理による hMSC の骨分化誘導は BMP2、Cox2、PTH1H の誘導によって引き起こされる可能性が示唆された。一方、Smad シグナル伝達系は Ti 表面の化学処理により抑制された。これまでに、noncanonical BMP シグナル伝達系が Cox2 の転写を制御するという報告もあるため、Smad シグナル伝達系とは独立した noncanonical BMP シグナル伝達系により Ca(OH)₂ 処理された Ti 表面上で培養した hMSC の骨分化を調整しているのかもしれない。

IPA によるパスウェイ解析を行ったところ、NaOH 処理によって骨分化におけるプロモーターである WNT 及びその細胞表面受容体 Frizzled、さらにその下流の Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路の様々な構成分子を結合させる足場タンパク質である Axin や APC の mRNA 発現が誘導された。また、RANKL decoy receptor である OPG の遺伝子発現が NaOH 処理により 2 倍以上上昇した。CaCl₂ 処理によって、Frizzled、Axin、APC 及び骨分化マーカー BMP と IGF-1 が誘導された。骨マトリックスタンパク質である OPN の発現が有意に上昇し、さらにそれに伴い integrin 3 の発現も誘導された。Ca(OH)₂ 処理によって Wnt 及び受容体 Frizzled に加えて Frizzled の共役受容体である LRP5/6 の遺伝子発現が誘導された。また、BMP、IGF-1、integrin 3 に加えて、破骨細胞分化因子である RANKL が Ca(OH)₂ 処理によって誘導された。さらに、OPN 及び OCN の遺伝子

発現が上昇した。

間葉系前駆細胞において Wnt / β -カテニンシグナル伝達経路は、骨分化を制御している。Ti の表面特性がカルシウム依存性の Wntシグナル伝達経路を介して骨分化を誘導し、Wnt5a が integrin との正のフィードバックを通して骨分化を増強するとの報告もある。これまでに、integrin ファミリーが様々な処理を施された Ti 表面上で骨分化における重要な役割を果たしている事が報告されている。本研究において、カルシウムイオン導入処理により、OPN 発現上昇に伴い integrin $\beta 3$ の発現誘導が観察された。hMSC における Wnt / β -カテニンシグナル伝達経路も、カルシウムイオン導入処理により促進され、その効果は CaCl_2 処理よりも Ca(OH)_2 処理の方が高かった。

本研究において、hMSC の骨分化誘導作用は Ca(OH)_2 処理の方が CaCl_2 処理よりも効果的であったが、これは両処理間における Ti 表面へのカルシウムイオン導入量及びアパタイト形成量の違いによるものかもしれない。Ti 表面への Ca(OH)_2 処理により、1) CaCl_2 処理に比べて BMP2、Cox2、PTH1H の発現が上昇し、2) Wnt / β -カテニンシグナル伝達経路が活性化されることによって hMSC の骨分化が誘導されることが示唆された。

カルシウムイオン導入した純 Ti は hMSC の骨分化を誘導することを見出し、2 種類の導入処理法を比較する事によりそのメカニズムの一端を明らかに出来たと考える。

2. 生体親和性高分子材料による hMSC の機能への影響について

生体親和性高分子材料による hMSC の機能への影響について検討するために、

組成比の異なる PME / PHEMA コポリマーのコーティング処理した表面上で hMSC を培養し、それぞれの細胞へ与える影響について検討を行った。

播種 24 時間後において、やはり PHEMA100% のコーティング処理したシート上では、hMSC が接着せず、浮遊の状態が存在していた。しかし、PME が 25% 以上含まれたコーティング処理のもの (PME, M75H25, M50H50, M25H75) では、hMSC は接着していた。この様に、コーティングしたポリマーの組成比を変える事で、hMSC の形態等に変化が見られることが分かった。次に、hMSC が接着した材料 (PME / PHEMA コポリマー 4 種類と PET) 上で培養した hMSC における遺伝子発現プロファイルについて網羅的に解析した。その結果、PET と比較し、生体親和性高分子材料によって発現が 2 倍以上上昇または誘導された遺伝子群について解析したところ、PME, M75H25, M50H50 の材料によって、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉転換) Pathway に関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった。EMT は、TGF β , Notch, Wnt, Receptor tyrosine kinases によって誘導されるため、それぞれのシグナル伝達についてコーティング処理による変化について検討したところ、TGF β 及び FGF Receptor や EGF Receptor を介した経路の誘導による EMT Pathway の亢進は全てのコーティング処理で認められた。一方、Notch 誘導による EMT Pathway の亢進は、PME のみ顕著にみられた。このことから、PME の割合が高い方が EMT Pathway が亢進され易い可能性が

示唆された。

EMT は近年、がん細胞の分化度の制御調節機構の一つとして着目されており、EMT の誘導により細胞の運動性の亢進や細胞外基質の蓄積、細胞老化の抑制、幹細胞様機能（未分化性など）の獲得などが示されている。以上より、生体親和性高分子上で培養した hMSC の遺伝子発現プロファイルの変化から、PMEA / PHEMA コポリマーコーティング材料が hMSC の運動性の亢進や未分化性の維持などへ影響を与える可能性が示唆された。

3. 生体親和性高分子材料による THP-1 の機能への影響について

組成比の異なる PMEAL/PHEMA コポリマーのコーティング処理した表面上で THP-1 を培養し、細胞へ与える影響について検討するために遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。各生体親和性高分子材料の THP-1 に与える影響について、THP-1 の遺伝子発現パターンによる階層的クラスタリングを行ったところ、dish と最も類似したパターンを示したのが、M75H25、M50H50、次いで M25H75、PHEMA、PMEA の順であった。また、dish と比較して生体親和性高分子材料によって発現が有意に変化（2倍以上上昇または 1/2 以下に低下）した遺伝子群の発現変化が疾病関連機能や生体機能に及ぼす影響について調べたところ、PMEA では有意に上昇する機能が多く見られ、反対に PHEMA では有意に低下する機能が多く見られた。一方、コポリマー（M75H25、M50H50、M25H75）は有意に影響を受ける機能は少なかった。この様に、生体親和性高分子材料によるコーティング処理は THP-1 の遺伝子発現に影響を与え、その大きさは PMEAL >

PHEMA > コポリマー（M25H75 > M75H25、M50H50）の順であった。このことから、コポリマー（両高分子ポリマーの共重合体）の方が、それぞれの高分子材料のみ（PMEA、PHEMA それぞれ 100%のもの）よりも細胞が影響を受けにくい材料である可能性が示唆された。

4. 高分子材料の内皮化評価について 高分子材料による血管内皮細胞（HUVEC 及び TIME-GFP）の機能への影響について

本研究では、医用材料の血液適合性評価の一つとして、血管内皮細胞を用いて材料における内皮化を評価するためのより最適な方法を探索した。

まず、従来材料の *in vitro* における内皮化の評価に使用されていた初代培養細胞の HUVEC と最近開発された不死化させた血管内皮細胞の TIME-GFP を用いて、高分子材料上で培養し、細胞接着と形態及び内皮化について比較検討した。3 ロットの HUVEC について検討したところ、材料への接着試験についてロットによる差が大きいことが明らかとなった。一方、TIME-GFP では HUVEC と同様の増殖傾向を示し、独立した 3 回の実験内での差も小さいことが確認された。

次に、TIME-GFP が各ポリマーコーティングしたシートに接着した際に、血管内皮細胞としての機能を保持しているか確認した。一酸化窒素合成酵素 3（Nitric oxide synthase-3；NOS-3）は主に血管内皮細胞で発現しており、この酵素によって合成される一酸化窒素（NO）には血小板凝集を抑制する作用がある。またトロンボモジュリン（Thrombomodulin；TM）は血管内皮細胞表面に存在し、トロンピンと複合体を形成して血液凝固を抑制することが知られ

ている。これら 2 遺伝子が各ポリマー上で培養しても発現しているかどうかについて定量 PCR 法により調べた。Dish 上で、TIME-GFP は NOS-3 及び TM を HUVEC と同程度発現しており、TIME-GFP は HUVEC と同程度の抗血栓作用が予測された。また、各ポリマーコーティングしたシート上でも Dish と比較して、NOS-3 や TM の発現が低下することはなかった。以上の結果により、材料に接着した TIME-GFP の細胞数を測定することで、材料の内皮化及びそれに伴う抗血栓性を予測できることが示唆された。初代培養細胞である HUVEC の場合、ロットによる接着傾向の違いや培養による細胞の変化によって実験の再現性や妥当性が下がる可能性が考えられるが、不死化された TIME-GFP は継代による細胞の変化もあまり見られず、また HUVEC と同様の接着傾向を示し、さらに材料上でも血管内皮細胞としての機能を保持していることから、血管内皮細胞を用いた材料の内皮化評価において TIME-GFP を用いる有用性が示唆された。

また、TIME-GFP を使用した材料への接着試験の応用について検討した。人工血管の内腔に内皮細胞の接着を促す処理を施した製品が開発されている。このような製品の品質管理として、内腔に目的とする処理がきちんと施されているか調べる必要がある。これは、内腔表面の化学組成等を調べることで可能であるが、一方で、血管内皮細胞の接着数が上昇するか *in vitro* で調べることは直接的で有効であると考えられる。TIME-GFP の材料への接着数を調べることで、ポリマーコーティング処理の割合をどの程度検出できるのか調べるために、面

積の 100%、50%を PME A 処理した PC シートに TIME-GFP を播種し、4 日間培養後の細胞増殖を解析した。その結果、PME A100%と 50%及び PME A50%と 0%の間の細胞増殖率に有意な差がみられた。以上の結果から、PC シートに PME A を処理した場合、50%の処理の違いは細胞数を測定することで検出できることがわかった。実際に製品に使用する医用材料及びその表面処理において、この試験をバリデーションすることによって品質管理試験として使用できる可能性が示唆された。

高分子材料による TIME-GFP の機能への影響について、遺伝子発現の網羅的解析も行った。

PTHFVE 及び PME A はどちらも TIME-GFP が比較的良く接着し、4 日間での増殖率も Dish と同程度であった。PTHFVE では、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は無く、また低下すると予想される機能も少なく、PTHFVE が細胞機能へ与える影響は少ないと考えられた。また、PME A も変化すると予想される機能は少ないものの、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は「造血前駆細胞の増殖」など 2 種類であり、PME A により血球系の細胞や血小板に影響を与える可能性のある機能の上昇が認められた。

PMe3A 及び PEOEVE はどちらも TIME-GFP 培養 1 日後の接着は PTHFVE や PME A よりも低かったが、4 日後にはどちらも増殖しており、増殖率はむしろ高い傾向を示した。PMe3A では、変化すると予想される疾病及び生体関連機能は 12 種類あり、TIME-GFP の機能へ及ぼす影響は少なくなかった。また、

PEOEVE は変化すると予想される疾病及び生体関連機能は 28 種類と多く TIME-GFP へ与える影響が大きいことが伺われた。さらに、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能 3 種類は全て「心血管疾患」に関わる粥性大動脈硬化症などの大動脈疾患に関わる機能であった。今後、実際に PEOEVE によって血管内皮細胞が動脈硬化症等の心血管疾患へとつながる変化を引き起こすのかどうかさらなる検討が必要であろう。

以上の結果から、コーティングするポリマーの種類によって血管内皮細胞の機能へ与える影響は異なることがわかった。ポリマーコーティングによる内皮化の評価として、ポリマー上への TIME-GFP の接着や増殖について検討した上で、さらに血管内皮細胞の機能への影響についても考慮する必要があるだろう。TIME-GFP を用いてそれぞれのポリマーについて内皮化の評価を行った今回の結果からは、TIME-GFP の接着や増殖も比較的良く、細胞の機能へ与える影響が少ないと予想される PTHFVE が、内皮化の評価は高いといえるのかもしれない。

E. 結論

1. 純 Ti 表面の化学処理が hMSC の骨分化へ及ぼす影響について

純 Ti の表面を化学処理 (NaOH 処理、CaCl₂ 処理、Ca(OH)₂ 処理) することによってカルシウムイオンの導入や Ti 上で培養した hMSC の骨分化へ及ぼす影響について検討した。カルシウムイオン導入量及びアパタイト形成量は CaCl₂ 処理に比べて Ca(OH)₂ 処理の方が有意に高かった。hMSC における OPN 及び OCN の発

現の検討から、Ti 表面へのカルシウム導入により hMSC の骨分化へ影響を与える事がわかった。また、Ca(OH)₂ 処理は骨分化を誘導するが、CaCl₂ 処理は限られた効果しか示さない事が判明した。Ca(OH)₂ 処理による hMSC の骨分化誘導は BMP2、Cox2、PTH1LH の誘導によって引き起こされる可能性が示唆された。さらに Smad シグナル伝達系とは独立した noncanonical BMP シグナル伝達系の関与も示唆された。hMSC における Wnt / -カテニンシグナル伝達経路も、カルシウムイオン導入処理により活性化され、その効果は CaCl₂ 処理よりも Ca(OH)₂ 処理の方が高かった。

2. 生体親和性高分子材料による hMSC の機能への影響について

hMSC への生体親和性高分子材料 (PMEA / PHEMA コポリマーのコーティング処理) の影響について検討したところ、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT ; 上皮間葉転換) Pathway に関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった。さらに、TGF- β 、FGF Receptor や EGF Receptor を介した経路の誘導による EMT Pathway の亢進は全てのコーティング処理で認められたが、Notch 誘導による EMT Pathway の亢進は、PMEA のみ顕著にみられた。

3. 生体親和性高分子材料による THP-1 の機能への影響について

THP-1 への生体親和性高分子材料コーティング処理による遺伝子群の発現変化が疾病関連機能や生体機能に及ぼす影響について調べたところ、PMEA では有意に上昇する機能が多く見られ、反対に PHEMA では有意に低下する機能が多く

見られた。一方、コポリマー (M75H25, M50H50, M25H75) は有意に影響を受ける機能は少なかった。生体親和性高分子材料による影響の大きさは PMEA > PHEMA > コポリマー (M25H75 > M75H25, M50H50) の順であった。

4. 高分子材料の内皮化評価について 高分子材料による血管内皮細胞 (HUVEC) 及び TIME-GFP の機能への影響について

本研究では、血管内皮細胞を用いて医用材料における内皮化を評価するためのより最適な方法を探索した。

従来、材料の *in vitro* における内皮化の評価に使用されていた初代培養細胞の HUVEC と最近開発された不死化させた血管内皮細胞の TIME-GFP を用いて、高分子材料上で培養し、細胞接着と形態及び内皮化について比較検討したところ、TIME-GFP は継代による細胞の変化もあまり見られず、また HUVEC と同様の接着傾向を示し、さらに材料上でも血管内皮細胞としての機能を保持していることから、血管内皮細胞を用いた材料の内皮化評価において TIME-GFP を用いる有用性が示唆された。

高分子材料による TIME-GFP の機能への影響について、遺伝子発現の網羅的解析も行ったところ、コーティングするポリマーの種類によって血管内皮細胞の機能へ与える影響は異なることがわかった。ポリマーコーティングによる内皮化の評価として、ポリマー上への TIME-GFP の接着や増殖について検討した上で、さらに血管内皮細胞の機能への影響についても考慮する必要があるだろう。TIME-GFP を用いてそれぞれのポリマーについて内皮化の評価を行った今回

の結果からは、TIME-GFP の接着や増殖も比較的良く、細胞の機能へ与える影響が少ないと予想される PTHFVE が、内皮化の評価は高いといえるのかもしれない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kono K., Takada N., Yasuda S., Sawada R., Niimi S., Matsuyama A., Sato Y. : Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*, 43, 146-149 (2015)
- 2) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Takada N., Kuroda T., Sawada R., Okura H., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y. : Characterization of *in vivo* tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R γ ^{null} mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regenerative Therapy*, 1, 30-37 (2015)
- 3) 澤田留美「再生医療等製品開発における動物実験 指針及び評価指標について」*オベリスク*, 20(1), 25-31 (2015)
- 4) 澤田留美「再生医療等製品とバイオマテリアル,そして評価指標」*バイオマテリアル 生体材料*, 33(1), 7-8 (2015)
- 5) Sasaki H., Takeuchi I., Okada M., Sawada R., Kanie K., Kiyota Y., Honda H., and Kato R.: Label-free morphology-based prediction of multiple differentiation potentials of human mesenchymal stem cells for early evaluation of intact cells. *PLOS ONE*, 9(4), e93952 (2014).

- 6) Kono K., Niimi S., and Sawada R. : Cyclin D2 promotes the proliferation of human mesenchymal stem cells. *J. Bone Marrow Res.*, 2: 136. 1000136 (2013).
- 7) Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., and Matsuoka A. : Calcium-incorporated titanium surfaces influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 101(9), 2573-85, (2013).
- 8) Ito-Nagahata T., Kurihara C., Hasebe M., Ishii A., Yamashita K., Iwabuchi M., Sonoda M., Fukuhara K., Sawada R., Matsuoka A., Fujiwara Y. : Stilbene Analogs of Resveratrol Improve Insulin Resistance through Activation of AMPK. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77(6), 1229-1235, (2013).
- 9) Sato Y., Tsutsumi H., Sawada R., Suzuki T., Yasuda S. : Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-proceed products. *Bull. Natl. Inst. Health. Sci.*, 131, 16-19, (2013).
- 10) 澤田留美「再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価の実際」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み、シーエムシー出版、東京 (2012) pp. 28-37
- 11) 松岡厚子、澤田留美、加藤玲子「次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療分野」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み、シーエムシー出版、東京 (2012) pp. 38-46
2. 学会発表
- 1) 河野 健, 新見伸吾, 澤田留美「間葉系幹細胞における細胞分化と LINE-1 の発現について」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)
- 2) 高田のぞみ, 河野健, 安田智, 澤田留美, 新見伸吾, 松山晃文, 佐藤陽治「細胞増殖特性を利用した不死化細胞検出試験法の性能評価」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)
- 3) 佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 澤田留美, 本多裕之, 清田泰次郎, 加藤竜司「骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化モニタリング」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)
- 4) 澤田留美, 河野 健, 比留間瞳, 加藤玲子, 新見伸吾「生体親和性高分子材料によるヒト単球細胞の機能の制御について 遺伝子発現の網羅的解析による検討」第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11)
- 5) 加藤玲子, 藪島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾「ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索」第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11)
- 6) Kono K., Niimi S., Sawada R.; Analysis of Line1 expression in human mesenchymal stem cells, 12th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2014.6)
- 7) Sasaki H., Okada N., Kanie K., Kiyota Y., Honda H., Sawada R., Kato R.; Image-based profiling of mesenchymal stem cells using non-label images, TERMIS-EU 2014 (2014.6)
- 8) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾「間葉

系幹細胞の増殖培養過程における品質評価のための遺伝子発現解析」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)

9) 河野 健, 新見伸吾, 澤田留美「間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)

10) 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 河野健, 野村祐介, 新見伸吾「ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖能に対する抗酸化剤の影響評価」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)

11) 佐々木寛人, 蟹江慧, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化の細胞形態と発現プロファイリングとの相関解析」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)

12) 佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 竹内一郎, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「細胞画像情報解析による間葉系幹細胞分化能の品質プロファイリング」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)

13) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾「間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究」第 36 回日本分子生物学会年会 (2013.12)

14) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Takada N., Kuroda T., Sawada R., Matsuyama A., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y.; Characterization of *in vivo* tumorigenicity test using severe immunodeficient NOG mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products,

World Stem Cell Summit 2013 (2013.12)

15) 澤田留美, 河野 健, 加藤玲子, 新見伸吾「生体親和性高分子によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (1): 遺伝子発現の網羅的解析」第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)

16) 加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾「生体親和性高分子によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (2): タンパク質発現の網羅的解析」第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)

17) Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., Matsuoka A.; The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

18) Kono K., Sawada R., Matsuoka A.; Overexpression of cyclin D2 promotes cell proliferation of human mesenchymal stem cells, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

19) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Kuroda T., Sawada R., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y.; Validation of *in vivo* tumorigenicity test for the process control of cell/tissue-engineered products using severe immunodeficient NOG mice, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

- 20) 澤田留美「再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価法の確立を目指して」日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5)
- 21) 松岡 厚子, 澤田 留美, 加藤 玲子, 河野 健「次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療分野審査 WG 活動報告」日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5)
- 22) 澤田留美、齋島由二、福井千恵、河野 健、松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について 遺伝子発現の網羅的解析による検討 」第 12 回日本再生医療学会総会(2013.3)
- 23) 齋島由二、澤田留美、福井千恵、松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について 蛋白質発現の網羅的解析による検討 」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 24) 河野 健、澤田留美、松岡厚子「細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 25) 草川森士、町田一彦、安田智、黒田拓也、澤田留美、伊藤守、堤秀樹、川真田伸、佐藤陽治「細胞・組織加工製品の製造工程管理法としての NOG マウス造腫瘍性試験系のバリデーション」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 26) 澤田留美、河野 健、松岡厚子「細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価 がん化の指標探索のための遺伝子発現解析 」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)
- 27) 河野 健、澤田留美、伊佐間和郎、齋島由二、松岡厚子「チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)
- 28) Sasaki, H., Matsuoka, F., Takahashi, A., Takeuchi, I., Sawada, R., Kiyota, Y., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based prediction of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 3rd TERMIS World Congress2012 (2012.9)
- 29) 澤田留美、齋島由二、福井千恵、河野 健、松岡厚子「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について (2) —遺伝子発現の網羅的解析による検討—」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 30) 齋島由二、福井千恵、澤田留美、松岡厚子「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(1) —蛋白質の網羅的発現解析による検討—」第 11 回日本再生医療学会 (2012.6)
- 31) 佐々木寛人、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司「骨髄由来間葉系幹細胞の画像情報解析による劣化度評価」第 11 回日本再生医療学会総会(2012.6)
- 32) 佐々木寛人、高橋厚妃、坪井泰樹、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司「間葉系幹細胞画像の情報解析による細胞状態分類法の有効性」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 33) Sasaki, H., Matsuoka, F., Takeuchi, I., Sawada, R., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based cell quality assessment of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2012.6)

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書：平成 24-26 年度 (3 カ年分)

分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討

研究分担者	植松美幸	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	薮島由二	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	中岡竜介	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	瀬川勝智	国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部
研究協力者	中野達也	国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部

要旨

体内に埋込む医療機器は生体への高い適合性が求められることが背景にある。新規材料に対して、長期的な埋込みによる生体適合性の評価をすることを考えると、実際の応用までに時間を要するが、材料開発段階でその予測ができれば、材料をより迅速に患者へ普及させることができると考える。その評価指標のひとつとして、本研究ではコンピュータシミュレーションによる評価指標の開発に取り組んできた。本研究では、比較的血液適合性が高いといわれる高分子材料である PMEА (Poly(2-methoxyethyl acrylate)) を対象にどのような条件でシミュレーションを行い、どのような解析によって値を示すことで、不凍水、中間水、バルク水の説明ができる指標となるのか、検討した。

背景・目的

研究の目的は医用高分子表面近傍の水和状態に着目し、分子動力的シミュレーションによって中間水の存在可能性を示すことである。

【平成 24 年度】水分子の吸着エネルギーや拡散係数、動径分布関数などによる解析手法を検討した。一方で、中間水の存在をすでに知られている DSC 分析他の手段で調べるために、NMR で PMEА の計測を試みた。

【平成 25 年度】平成 24 年度の NMR での解析結果を受けて、PMEА 中のメキシ基周辺に中間水が存在する可能性が認められた。これから、メキシ基周辺の水分子の振る舞いについて、水分子の存在する個数を求め、メキシ基と水分子との相対速度から中間水を示すことを試みた。

【平成 26 年度】不凍水、中間水、バルク水の差異を示すために、PMEА 中に存在する水分子について、位置、吸着力、変位を数値化した。Adsorption Locator によって官能基への水の吸着力、水の持つエネルギーを示し、吸着させた水の離れやすさを比較することで、高

分子内への水の取込み力を調べ、また、水分子の補足時間を示すことで緩やかに存在する水分子の存在について示すことを試みた。

方法

【平成 24 年度】中間水の存在を示すための指標として、分子動学的シミュレーションによって算出させる数値のうち、拡散係数、動径分布関数、吸着エネルギーを用いることで、材料周りの水分子の振る舞いを示す。

6wt%のPMEAを基準として、PMEAと水の比率を算出した。バルクのPMEAの密度が約 1.2g/cm^3 であることから、重合数は50とし、約30の立方体セルに3本鎖を配置し、水分子を60個配置した。周期境界条件を設定し、温度が300Kのもとで分子動学的シミュレーションを行った。トータルエネルギーが安定したときの200ps分のtrajectoryを取り出し、材料中の官能基に対する水分子の配置について動径分布関数を求めた。

PMEAの酸素原子に対する水の吸着エネルギーについてAdsorption Locatorモジュールを用いて(Accelrys社)シミュレーションした。50量体のPMEAの1本鎖に対して、20個の水を配置する。ここで、酸素原子は(A)メトキシ基の酸素原子、(B)エステル結合カルボニル酸素原子、(C)エステル結合酸素原子の3つの種類がある。全酸素原子に対して、水を配置させる場合に対して、それぞれの酸素原子に限定的に水を配置させる場合の吸着エネルギー比較を行う。これにより、どこの酸素原子に配置するのが最も安定的となるのか探索した。

固体NMRにてPMEAの計測を行い、材料中に取り込まれている水の存在とその位置推定を行った。(1) ^1H -NMR、(2) ^{13}C -NMR / J-DEPT45、(3) ^1H - ^{13}C J-HETCOR、(4) ^1H - ^{13}C J-HETCORのスライスデータ、(5) ^{13}C -CPMAS、(6) CP-HETCOR、(7) CP-HETCORのスライスデータ、(8) NOESYの結果からPMEA中の水の存在とその位置について可能性を探った。

【平成 25 年度】NMRの結果からPMEAのメトキシ基近傍に存在する水が中間水であるという予測のもと、isotacticとsyndiotacticの構造の違いでメトキシ基周りの水に違いが出るのか検討した。PMEAは水に溶ける材料ではないため、周りに多くの水が存在しないモデルがよいだろうと想定し、0のPMEAに対して、100個の水分子を与えたCell構造を作成してシミュレーションを行った。密度が 1.22g/cm^3 に対して、1辺23.06であった。Forcite Plusを用いて、Annealingを300Kから500Kで5サイクル行い、Dynamicsを行った。ここでDynamicsはNVTで50,000ステップ(50ps)、NVEで100,000ステップ(100ps)行った。この結果について、解析を進めた。

メトキシ基周辺の水の個数については、Materials Studioに付属するPipeline Pilotを介して、

MaterialsScript API を利用し、自作の Perl のプログラムを併用しながら行った。トキシ基周りに中間水が存在するという仮定のもと、メトキシ基の酸素原子から 1 箇の距離に応じた存在する水の個数を算出し、メトキシ基の酸素原子からの距離に応じて、1 箇に範囲を設定し、その中に入る水分子について、メトキシ基に対する水の相対速度を算出した。

【平成 26 年度】平成 25 年度の結果から、中間水の存在を示すにあたり、メトキシ基と水の相対速度では十分に示せそうにないだろうと考え、PMEA 中の酸素原子に対する水分子の分類を試みた。まず、構造は isotactic に限定し、Conformer を用いてモノメトリックな構造を作成した上で、らせん状になる 50 量体を初期材料として設定した。

材料中の酸素原子へ強制的に 3[]となる位置へ水分子を配置する。吸着力の違いを比較することで、水分子の取り込みやすさを調べた。そして、材料中に水を取り込んだ状態を作り出し、周りに飽和状態の水が存在し、分子動力的シミュレーションを行った。平衡状態となったときでも、材料中に最初に取り込んだ水を取込み続けるかについて検討した。

また、分子動力的シミュレーションの結果から、官能基周辺の水分子の補足時間を調べることで、中間水としての振る舞いを示すことを試みた。メトキシ基に対する周りの水分子の距離の時間推移を算出し、全フレームの平均距離が小さいものから順にグラフ化した。このときのシミュレーション条件としては、力場は COMPASS II、温度は 298K で一定とし、温度制御は Nose-Hoover-Langevin (NHL)、Electrostatics terms は Particle-Particle and Particle-Mesh (PPPM)、van der Waals terms は Ewald として、0.25[psec] ごとに 1 フレームとして 50[psec]分出力するとした。

結果・考察

【平成 24 年度】シミュレーションの結果から、官能基に対する水の動径分布関数から水素結合の配置位置、拡散係数から水の動きやすさを示した。

自己拡散係数は PHEA、PBA、PMEMA、PHEMA、PEA、PMEA、PPEA の順に低下した。すでに検討したモノマー周りに水を飽和状態に配置させたときの分子動力的シミュレーションの結果によれば、PHEA、PBA、PMEA、PHEMA、PEA、PPEA、PMEA という順であった。水の配位数もこれまでの実験方法とは異なっているので、単純比較はできないが、PMEA、PMEMA の順番に入れ替わりがあるものの、モノマーの場合と今回のオリゴマーのときとではほぼ同じ並びであった。DSC では PMEA のみ中間水の存在が予想されていることから、今回のシミュレーション結果のみから、どこまでが妥当な結果を示しているのか線引きができなかった。また、水が少ないと計算誤差も増えるため比較が難しかったことや、水の拡散係数を基準とした比較用の指標の重要性から、現実的な密度を基準にした水分子の配置より、飽和状態に水分子を配置したモデルの方が、本シミュレーションにはよさそう

であると考えられた。また、分子動力的シミュレーションで中間水の存在を示すには、飽和状態の水に対して、全体の水の拡散係数を算出するよりも、官能基に対する距離に応じた水の動きやすさとしての値を求めることがふさわしいと考え、これを今後の方針とした。また、吸着エネルギーや動径分布関数を用いることで、どの位置に吸着しやすく、官能基からどれぐらいの距離に水分子が存在しているのかを示す指標となると考えられた。PMEA と PMEMA については、水の配置位置はほぼ同様であったが、エステル結合のカルボニル酸素原子での水素結合の大きさに違いがあること、また、水の動きやすさとしての拡散係数に差があることから、エステル結合のカルボニル酸素原子周辺の水の動きにくさが影響したものと考えた。今後、中間水の存在をシミュレーションとして示すためには、PMEA と PMEMA のメチル基の有無によって、この水の動きにくさに違いがどのように現れるかに着目して進めるのがよいと考えた。

高分子材料に含まれる中間水の存在との関係性が示唆された。NMR での計測結果からも、PMEA には高分子に取り込まれた水の存在があると考えられ、それがメトキシ基の酸素原子に存在するものであると推察された。メトキシ基は運動性がよく、そこに取込まれている水をシミュレーションから表現することが本研究の目指すところとなると考えられた。

【平成 25 年度】 MEA を対象とし、これまでの実験、シミュレーションによって予測されたメトキシ基の酸素原子近傍の水分子の振る舞いについて、解析した。isotactic の結果、(syndiotactic の結果について、いずれも 5 回の試行の結果から検討したが、似通った結果もあれば、異なる結果もあった。平均した結果での比較を行うにはサンプル数が十分でないと考え、isotactic のときの水分子の数よりも syndiotactic のときの水分子の数の方が相対的に多いと見受けられた。水分子の平均 2 乗距離変位が時間に対して線形となっている部分を取り出し、Cell 内全体の水分子についての拡散係数を計算し、5 試行数分で平均してみると、isotactic が 6.7×10^{-6} [cm^2/s]、syndiotactic が 6.8×10^{-6} [cm^2/s]となった。ただし、取り出す時間幅などによっても結果が異なることに注意は必要である。より多くの試行数で傾向を見ていく必要があるとは思いますが、現在の結果を見ると、水分子全体の動きとしては isotactic と syndiotactic に大きな差異はないと思われた。

また、100ps のデータに対して解析をしたところ、近い距離にあっても、離れた距離にあっても水分子の平均的な速度に違いはなかった。解析前には中間水というのはメトキシ基に対してほぼ固定で大きく外れることなくとどまり続ける水であると考えていた。そのため、酸素原子間の同程度距離関係ある水分子は同じように振る舞うと考え、メトキシ基側の酸素原子からの 1 毎に区切られた範囲での水分子全体をひとまとまりで考えるアルゴリズムを用いた。しかしながら、動画から水分子がメトキシ基の近くに存在しているのを確認することができる。これから、中間水とバルク水との差を示すには全体の水分子の統

計的データによって示すのは難しく、それぞれの水分子の振る舞いについての傾向をグループ化した上で比較検討するのがよいと考えられた。中間水の振る舞いを捉えるために、全フレームの統計的な解析ではなく、官能基に捕捉された時間を見ていくことを提案した。

【平成 26 年度】これまでの結果から、材料中に存在する水分子のグループ化をした上で、その動きを捉えることが、不凍水、中間水、バルク水の違いを示すことにつながると考えていた。PMEA の 50 量体内にある 2 種類の酸素原子について、水分子の吸着力の強さと離れやすさ、とどまりやすさについて比較検討した。エステル結合カルボニル酸素原子への水分子の吸着力が大きいことは、不凍水が存在すること、また、メトキシ基の酸素原子にはより緩やかな吸着になっていることの手掛かりとなると示唆された。

次に、官能基に強制的に水分子を配置させ、周りの水分子が多く存在したときに平衡状態となると、最初に吸着させておいた水分子は外に出て行くか否か、エステル結合カルボニル酸素原子、メトキシ基の酸素原子に対して、平均二乗変位の傾きの差、動径分布関数の時間推移をみたところ、不凍水が存在すると考えられているエステル結合カルボニル酸素原子については、吸着力がより強く、周りの水分子に対しても動きが小さく、拡散しづらい。中間水が存在すると考えられているメトキシ基の酸素原子については、周りの水分子（バルク水）と同化してしまう可能性があると考えられた。

本方法は周辺に存在する水分子が不凍水であるか、他の水であるかの違いにつながる指標として使える可能性はあるが、中間水とバルク水との違いを示す指標とするには難しそうであると考えられた。

そこで、中間水の振る舞いを示すために、官能基に捕捉された時間を算出し、水分子毎に示すことで水の分類を行った。近くにとどまり続ける水分子と遠くに存在しつづける水分子とがあり、これが中間水の特徴を示すためのきっかけと考えられた。メトキシ基の酸素原子も水分子中の酸素原子も運動しているので、値の変動も大きく、波形にスムージングをかけてノイズ除去も試みたが、決め手に欠けている。距離の時間微分によって、水分子が一時的に存在するのか、とどまる状態にあるのかということを示し得ると考えており、とどまる状態がみられたところで、時間積分をすることによって、メトキシ基に対してどれぐらいの距離に水分子が存在しているのか把握できると考えている。今後は中間水が見られないといわれる材料との比較を行いながら、検討を進めていきたい。

総括

本研究では NMR によって PMEА 中に含まれる水の存在可能性とその位置を探り、分子動力的シミュレーションによって、中間水の表現を様々なアプローチで試みた。3 年間の結果を受けて導かれたのは次の 2 点である。

- 1) PMEA 中に含まれる酸素原子に対して水素結合を強制的に作ったときの吸着エネルギー比較や吸着させた水分子が周りに拡散していくか検討することで、不凍水としての示し方ができるのではないかとということ。
 - 2) 2) 酸素原子の周りに存在する水分子の捕捉時間を算出することで、中間水としての存在を示す指標となりうるのではないかとということ。
- 今後は中間水の有無に応じて、他の材料との比較を進め、本法の妥当性について検討していきたい。

業績（論文）

- (1) Muragaki Y, Uematsu M, Iseki H, Umezu M: Analysis of Benefit-risk Balance in Decision-making of the Food and Drug Administration for Pre-market Approval of Therapeutic Medical Devices, *Advanced Biomedical Engineering* 2 101-106 2013 年
- (2) Uematsu M, Asato K, Ichihashi T, Umezu M, Nakaoka R, Matsuoka A, Aomi S, Iimura H, Suzuki T, Muragaki Y, Iseki H., A surgical navigation system for aortic vascular surgery: a practical approach, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2013; 2013:5327-30 2013 年

業績（学会発表）

- (1) M. Uematsu, Y. Haishima, R. Nakaoka, T. Nakano, K. Segawa and S. Niimi : Developing a Biocompatibility Evaluation System Utilizing Molecular Dynamics Simulation of Hydration on Surface of Biomaterials, The 54th Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering, May 2015 (accepted)
- (2) 植松美幸, 齋島由二, 中岡竜介, 中野達也, 瀬川勝智, 新見伸吾: 分子動力的シミュレーションによる PMEA 分子に存在する水の挙動解析, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2014 年 11 月
- (3) 植松美幸, 高橋泰浩, 梅津光生, 中岡竜介, 新見伸吾, 青見茂之, 飯村浩, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋, 岩崎清隆. ユーザビリティを考慮した大血管ナビゲーションの設計開発, *日本コンピュータ外科学会誌*. 16 (3): 329-330 2014 年 11 月
- (4) 植松美幸, 齋島由二, 中岡竜介, 新見伸吾, 瀬川勝智, 中野達也: 血液適合性評価のための中間水同定シミュレーション, *日本バイオマテリアル学会大会予稿集* 35th 396 2013 年 11 月
- (5) 植松美幸, 此枝央人, 櫻井裕之, 正宗賢, 中岡竜介, 新見伸吾, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋: 皮弁挙上時の血管走行把握を支援するナビゲーション誤差検討, *日本コンピュータ外科学会誌* 15(2) 202-203 2013 年 8 月

- (6) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 新見伸吾, 中野達也, 瀬川勝智: 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析(第2報), 高分子学会医用高分子シンポジウム講演要旨集 42nd 61-62 2013年7月
- (7) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也: 医用高分子材料の表面近傍における水和状態のシミュレーション的評価, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム予稿集 2012 355 2012年11月
- (8) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也: 医用高分子材料の生体適合性評価指標開発に向けた分子動力的シミュレーション, 人工臓器(日本人工臓器学会) 41(2) S.219 2012年11月
- (9) 岸本眞治, 村垣善浩, 岡本淳, 吉光喜太郎, 鈴木孝司, 伊関洋, 吉澤晋, 梅村晋一郎, 植松美幸, 松岡厚子, 阿部信隆, 仲本秀和, 鍋木正志, 川畑健一, 石井宏志: 先端医療機器開発における国際標準化の役割, 日本レーザー医学会誌 33(3) 282 2012年10月
- (10) 安里権也, 植松美幸, 市橋琢弥, 梅津光生, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 飯村浩, 青見茂之, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋: 解剖学的特徴点計測における誤差評価についての実験的検討, 日本コンピュータ外科学会誌 14(3) 224-225 2012年10月
- (11) 植松美幸, 市橋琢弥, 安里権也, 梅津光生, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 飯村浩, 青見茂之, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋: TAAA Navigator の開発と臨床的評価の実際, 日本コンピュータ外科学会誌 14(3) 356-357 2012年10月
- (12) 市橋琢弥, 植松美幸, 安里権也, 梅津光生, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 東隆, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋: 弓部大動脈瘤用ステントグラフト留置過程のデータに基づく可視化に向けた初期的検討, 日本コンピュータ外科学会誌 14(3) 396-397 2012年10月
- (13) 此枝央人, 櫻井裕之, 植松美幸, 佐藤生馬, 上内洋輝, 正宗賢: 穿通枝皮弁(DIEP flap)挙上時の血管走行可視化の試み, 日本形成外科学会誌 32(7) 535 2012年7月
- (14) 植松美幸, 藪島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 中野達也, 瀬川勝智: 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析(第1報), 高分子学会医用高分子シンポジウム講演要旨集 41st 61-62 2012年6月

分担研究総合報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名

アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析

研究分担者 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第四室長

研究協力者 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官

研究要旨：アパタイト形成能が高い材料は、生体骨と直接結合でき、骨系埋植医療機器への応用が期待できる。我々は、チタンにアパタイト形成能を付与するために、アルカリ処理後に塩化カルシウム又は水酸化カルシウムを用いて、チタン材料表面にカルシウムを導入した。これらの処理を施したチタンの表面形状及び表面化学状態を解析した。さらに、短時間の擬似体液浸漬による表面化学状態変化を解析した。その結果、 CaCl_2 処置及び $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理を施しても、 NaOH 処理によって形成された網目形状が保持されていた。また、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理によってチタン表面にはチタン酸カルシウムが形成されていた。さらに、擬似体液浸漬によって、 CaCl_2 処置したチタンではカルシウムの漏出が示唆されたが、水に不溶性のチタン酸カルシウムが表面に形成された、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理したチタンではリン酸イオンの吸着が示唆された。チタンへの $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理は、チタン酸カルシウムの形成によって、高いアパタイト形成能を発揮したと考えられる。

A. 研究目的

骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成することが知られている。擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、埋植後に生体骨と早期に直接結合することが期待できる。我々は、擬似体液としてハックス平衡塩溶液を用いて、フーリエ変換赤外光音響分光法によるアパタイト形成能の定量的評価法を検討し、高いアパタイト形成能を付与するために材料表面にカルシウムを導入したチタン合金等のアパタイト形成能を評価した。その結果、水酸化カルシウムを用いてカルシウムを導入

したものは、塩化カルシウムを用いてカルシウムを導入したものと比べて、高いアパタイト形成能を獲得し、カルシウム導入量とアパタイト形成能との間に正の相関が認められた。

さらに、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) によって、カルシウム導入処理を施したチタン及びジルコニウムの擬似体液浸漬時におけるイオンの吸着挙動とアパタイト形成能との関係を解析した。その結果、水酸化カルシウムを用いてカルシウムを導入したチタン及びジルコニウムは、それぞれの材料の中で最も高いアパタイト形成能を示し、どちらも擬似体液浸漬初期からリン酸イオンの吸着量

が経時的に増加したことから、これらの材料の高いアパタイト形成能は早期のリン酸イオンの吸着に起因していると考えられた。

また、網羅的遺伝子発現解析から、チタンにカルシウム導入処理を施すことによって、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の Wnt シグナル伝達経路が活性化され、さらに、骨形成に関する転写因子などの発現が誘導または上昇した。これらの現象は、チタンのカルシウム導入量及びアパタイト形成能の増加に依存することが示唆された。

このように、チタンにカルシウム導入処理を施すことによって、高いアパタイト形成能を付与し、さらに、間葉系幹細胞の骨分化誘導が可能になる。今年度は、カルシウム導入処理を施したチタンの表面性状を解析し、表面処理によってもたらされた表面化学状態を明らかにした。さらに、カルシウム導入処理を施したチタンを擬似体液に短時間浸漬した後の表面化学状態の変化を解析した。

B. 研究方法

1. 試験材料

株式会社高純度化学研究所製の純チタン片（純度：99.9%、金属不純物：Al 0.003%、Cr 0.005%、Fe 0.02%、Ni 0.003%、サイズ：5 mm×5 mm×1 mm）を用いた。試料片は、酢酸エチル、アセトン、エタノール及び超純水の順に、超音波洗浄した後に使用した。

2. 表面処理

(1) NaOH 処理

試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液（和光純薬工業株式会社）3.5 mL を加え、60°C で 24 時間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

(2) CaCl₂ 処理

NaOH 処理した試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.1 mol/L 塩化カルシウム水溶液 3.5 mL を加え、60°C で 24 時間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

(3) Ca(OH)₂ 処理

NaOH 処理した試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.01 mol/L 水酸化カルシウム水溶液 3.5 mL を加え、60°C で 24 時間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

3. 擬似体液浸漬

表面処理した試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、37°C に加温したカルシウム及びマグネシウムイオンを含有するハックス平衡塩溶液（インビトロジェン株式会社）7 mL を加え、37°C に設定したインキュベータ内に 15 分間または 30 分間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

4. ICP-MS

試料表面に導入されたカルシウム量を求めるため、試料を 10%硝酸に 37°C で 2 時間浸漬した後、その浸漬液を超純水で 2 倍に希釈し、5%硝酸溶液とした。その溶液中のカルシウム濃度を ICP-MS 法により測定した。

5. 走査型電子顕微鏡（SEM）観察

イオンスパッタリング装置 JFC-1500（日本電子株式会社）を用いて、試料表面に金を 20 nm の厚さにコーティングした。その後、走査型電子顕微鏡 JSM-5800LV（日本電子株式会社）を使用して、加速電圧 15 kV で試料の表面形状を観察した。

6. X 線光電子分光分析（XPS）

ESCA-3200（株式会社島津製作所）を使用して、試料表面の化学状態を分析した。XPS

スペクトルの解析には、XI Spectral Data Processor v4.3 (XPS International, LLC) を使用した。なお、結合エネルギーの帯電補正は、炭化水素の C 1s ピーク (285.0 eV) を基準とした。

C. 研究結果

1. カルシウム導入量

表面処理による試料表面へのカルシウム導入量の測定結果を図 1 に示した。CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理によってチタン表面にカルシウムが導入されたことが確認された。また、Ca(OH)₂ 処理によるカルシウム導入量は、CaCl₂ 処理によるカルシウム導入量の 2.75 倍であった。

2. 表面処理後の表面形状

未処理のチタン表面は、研磨痕を除いて、平坦な形状が観察された。一方、NaOH 処理、CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理したチタン表面は、いずれも網目形状が観察され、各処理間に明らかな相違は認められなかった。

3. 表面処理後の表面化学状態

表面処理した試料の XPS スペクトルを図 2 に示した。未処理のチタンの XPS スペクトルには、炭素に由来するピークを除き、チタン及び酸素に由来するピークのみが認められた (図 2a)。また、NaOH 処理したチタンの XPS スペクトルには、未処理のチタンで観察されたピークの他に、ナトリウムに由来するピークが認められた (図 2b)。一方、CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理したチタンの XPS スペクトルには、ナトリウムに由来するピークに換わって、カルシウムに由来するピークが認められた (図 2c, d)。

未処理のチタンの O 1s ピークに比べて、NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したチタンの O 1s

ピークは、高結合エネルギー側に化学シフトしていた。一方、Ca(OH)₂ 処理したチタンの O 1s には、少なくとも 2 つ以上のピークが認められた。そこで、カルシウム導入処理に使用した塩化カルシウム水和物及び水酸化カルシウム並びにチタン酸カルシウムの O 1s XPS スペクトルと比較したところ、Ca(OH)₂ 処理したチタンの O 1s ピークは、チタン酸カルシウムの O 1s ピークと相似していた。Ca(OH)₂ 処理したチタン及びチタン酸カルシウムの O 1s のピークフィッティング解析の結果、どちらもおよそ 530.1 eV 及び 531.7 eV にトップを持つ 2 つにピークに分離され、それら 2 つのピーク面積の割合も一致した (530.1 eV : 46% 及び 531.7 eV : 54%)。

4. 擬似体液浸漬後の表面化学状態

未処理のチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬による変化が認められなかった。NaOH 処理したチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬によってナトリウムのピークが相対的に減少し、新たにカルシウムのピークが認められた。また、CaCl₂ 処理したチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬前には認められなかったナトリウムのピークが認められた。一方、Ca(OH)₂ 処理したチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬前には認められなかったリンのピークが認められた。

D. 考察

チタン合金に骨結合性を付与するためのアルカリ加熱処理技術が開発され、すでに人工股関節に応用された。さらに、アルカリ処理したチタン合金を塩化カルシウム水溶液に浸漬し、表面にカルシウムを導入する方法が検討された。チタン合金は、NaOH 処理により、チタン酸水素ナトリウムの層が材料表面に形成される。その後、塩化カルシウム水溶液に

浸漬すると、ナトリウムがカルシウムとイオン交換して、チタン酸水素カルシウムに変化する。我々は、水酸化カルシウム水溶液を用いたアルカリ性条件下で、NaOH 処理したチタン合金にカルシウムを導入する方法を検討した。その結果、Ca(OH)₂ 処理したチタン合金は、NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したチタン合金に比べて、高いアパタイト形成能を示した。さらに、擬似体液浸漬時におけるイオンの吸着挙動を解析したところ、Ca(OH)₂ 処理したチタンの高いアパタイト形成能は、早期のリン酸イオンの吸着に起因していることが示唆された。そこで、カルシウム導入処理を施したチタンの表面形状及び表面化学状態を解析した。さらに、カルシウム導入処理を施したチタンの擬似体液浸漬時における表面化学状態の変化を解析した。

既報と同様に、NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したチタン表面は、網目形状が観察された。Ca(OH)₂ 処理したチタン表面も、それらと類似した網目形状が観察され、NaOH 処理後に水酸化カルシウム水溶液で処理を施しても、NaOH 処理によって形成された網目形状が保持されたものと考えられる。

XPS スペクトルから、NaOH 処理によって導入されたナトリウムが (図 2b)、CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理によって完全にカルシウムに置換されたことが確認できた (図 2c, d)。

また、O 1s XPS スペクトルから、NaOH 処理したチタンの O 1s ピークと CaCl₂ 処理したチタンの O 1s ピークは相似しており、NaOH 処理によって形成されたチタン酸水素ナトリウム中のナトリウムがカルシウムとイオン交換したことを支持している。一方、Ca(OH)₂ 処理したチタンの O 1s ピークは、それらのピークとは明らかに異なり、むしろチタン酸カルシウムの O 1s ピークと相似していた。ピークフィッティング解析の結果、Ca(OH)₂ 処理

したチタンとチタン酸カルシウムの O 1s ピークは、結合エネルギー及び存在比率が一致するそれぞれ 2 つにピークに分離された。これらのことから、Ca(OH)₂ 処理したチタン表面には、チタン酸カルシウムが形成されたことが示唆された。

CaCl₂ 処理したチタンは、NaOH 処理によって導入されたナトリウムが、塩化カルシウム水溶液で処理することによって、完全にカルシウムと置換していた。しかし、15 分間及び 30 分間の擬似体液浸漬によって、カルシウムの一部が再びナトリウムと置換していた。CaCl₂ 処理したチタンのアパタイト形成能が、NaOH 処理したチタンのアパタイト形成能と比べて、顕著に向上しないのは、導入されたカルシウムの漏出によるものと考えられる。一方、Ca(OH)₂ 処理したチタンを擬似体液に浸漬してもナトリウムが検出されなかったことは、Ca(OH)₂ 処理によってチタン表面に水に不溶性のチタン酸カルシウムが形成されたことを支持している。また、Ca(OH)₂ 処理したチタンのみで 15 分間及び 30 分間の擬似体液浸漬によってリンが検出されたことは、Ca(OH)₂ 処理したチタンの高いアパタイト形成能が早期のリン酸イオンの吸着に起因していることを支持している。

E. 結論

CaCl₂ 処置及び Ca(OH)₂ 処理を施しても、NaOH 処理によって形成された網目形状が保持されていた。また、Ca(OH)₂ 処理によってチタン表面にはチタン酸カルシウムが形成されていた。さらに、擬似体液浸漬によって、CaCl₂ 処置したチタンではカルシウムの漏出が示唆されたが、水に不溶性のチタン酸カルシウムが表面に形成された、Ca(OH)₂ 処理したチタンではリン酸イオンの吸着が示唆された。チタンへの Ca(OH)₂ 処理は、チタン酸カルシ

ウムの形成によって、高いアパタイト形成能を發揮したと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A: The effect of calcium ions incorporation into titanium surface by chemical treatment on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A, 2573-2585 (2013).
- 2) Haishima Y, Isama K, Fukui C, Yuba T, Matsuoka A: A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A, 2630-2643 (2013).

2. 学会発表

- 1) Isama K, Kawakami T, Matsuoka A: Apatite Formation on Ca-Incorporated Ti-Zr Based Alloys in Simulated Body Fluid, *The 9th World Biomaterials Congress* (2012.3, Chengdu)
- 2) 伊佐間和郎、河上強志、松岡厚子：カルシウム導入したジルコニウムのイオン吸着挙動とアパタイト形成能、*日本金属学会 2012 年秋期講演大会* (2012.9、松山市)
- 3) 伊佐間和郎、河上強志、松岡厚子：カルシウム導入したチタン及びジルコニウムの擬似体液浸漬によるアパタイト形成、*日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012* (2012.11、仙台市)

- 4) 河野健、澤田留美、伊佐間和郎、齋島由二、松岡厚子：チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導、*日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012* (2012.11、仙台市)
- 1) 齋島由二、河上強志、福井千恵、田上昭人、柚場俊康、伊佐間和郎、松岡厚子：DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発 –可塑剤溶出量と溶血性の関係について–、*日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012* (2012.11、仙台市)

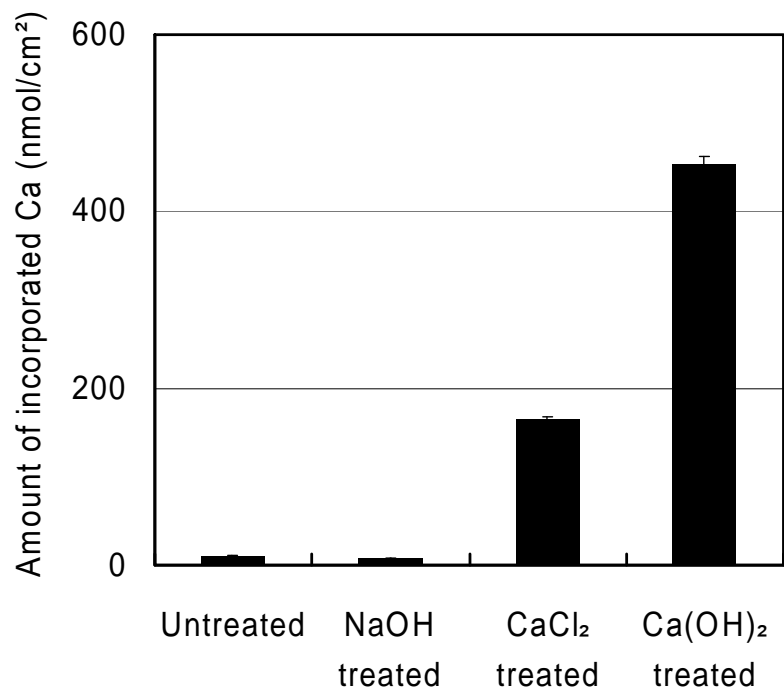


図1 チタン表面へのカルシウム導入量

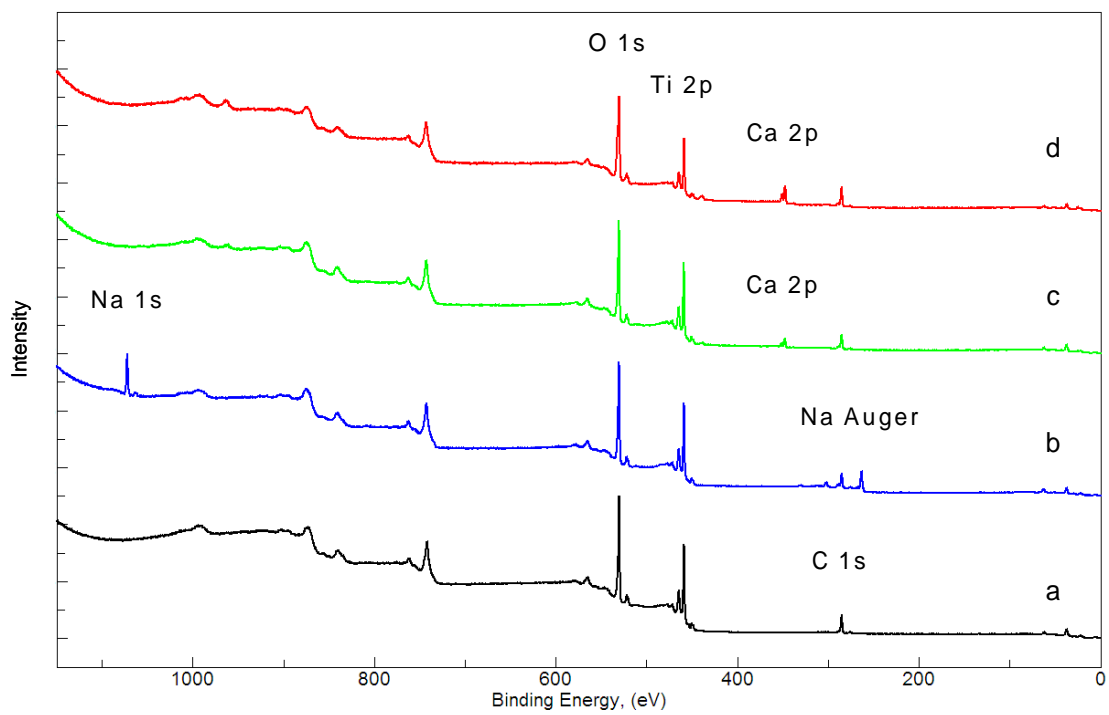


図2 表面処理を施したチタンの XPS スペクトル

a: 未処理、b: NaOH 処理、c: CaCl₂ 処理、d: Ca(OH)₂ 処理

分担研究総合報告書
厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名
タンパク質吸着の動力学的解析

研究協力者 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第四室長
研究分担者 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官

研究要旨：ポリマーに対する血液適合性評価マーカー候補タンパク質の吸着挙動を動力学的に解析するため、電極表面が血液適合性ポリマーである poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA)、 poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) 及び組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体 (PHM7525、PHM5050 及び PHM2575) 並びに汎用ポリマーであるポリエチレンテレフタレート (PET)、ポリブチレンテレフタレート (PBT)、ナイロン 6 (PA6) 及びナイロン 66 (PA66) でコーティングされた水晶発振子マイクロバランス (QCM) センサーを作製した。QCM 法により、これらのポリマー表面に対するアルブミン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン及びビトロネクチンの吸着に伴う平衡定数及び速度定数を求めた。その結果、いずれのタンパク質においても、結合定数及び結合速度定数は、汎用ポリマー (PET、PBT、PA6 及び PA66) より生体適合性ポリマー (PHEMA、PMEA 及び HEMA/MEA ランダム共重合) の方が小さく、解離定数及び解離速度定数は、汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が大きかった。特に、フィブロネクチン及びビトロネクチンにおいて、これらの傾向は顕著であった。フィブロネクチン及びビトロネクチンの吸着挙動からポリマーの血液適合性をスクリーニングできる可能性が示唆された。

A. 研究目的

医用材料の界面特性のひとつであるタンパク質吸着は、その材料が持つ血液適合性に関与することが知られている。そのため、材料に選択的に吸着する又は吸着しないタンパク質を指標として、その材料の血液適合性を評価したり、予測したりすることが可能であると考えられている。そこで、高分子材料に吸着する血漿タンパク質の網羅的比較定量解析

から、タンパク質の吸着量を指標として数種類の血漿タンパク質が血液適合性評価マーカーの候補として挙げられ、それらの有用性が検証された。しかし、高分子材料へのタンパク質の吸着現象を議論するに当たり、平衡状態における吸着量 (平衡定数) のみでは不十分であり、タンパク質の吸着速度 (速度定数) に関する情報の補足が求められている。

水晶振動子は、水晶の結晶を極薄い板状に

切り出した切片の両側に金属薄膜を取り付けた構造をしたもので、それぞれの金属薄膜に交流電場を印加すると、ある一定の周波数（共振周波数）で振動する。この時、この金属薄膜上にナノグラムオーダーの物質が吸着すると、その質量に比例して共振周波数が減少するという性質がある。この性質を利用して、金属薄膜上の微量な質量変化を計測することができる。このような方法論は、水晶発振子マイクロバランス（Quartz Crystal Microbalance; QCM）と呼ばれている。さらに、QCM法は、金属薄膜表面への物質の吸脱着をリアルタイムでモニタリングできるため、平衡状態にある物質の吸・脱着量のみならず、吸・脱着速度に関する情報も得ることができるという特長がある。したがって、予め金属薄膜を高分子材料でコーティングすれば、その材料に吸脱着する物質の質量をリアルタイムで測定することができるため、材料に吸脱着する物質の平衡定数及び速度定数を求めることが可能になる。

そこで、金電極表面を血液適合性ポリマー及び汎用ポリマーでコーティングしたQCMセンサーを作製し、ポリマー表面に対する血液適合性評価マーカー候補タンパク質等の吸着挙動を動力学的に解析した。

B. 研究方法

1. 試験材料

タンパク質の吸着挙動を評価する生体適合性ポリマーとして、poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA)、poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) 及び組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体 (HEMA/MEA=75/25; PHM7525、50/50; PHM5050 及び 25/75; PHM2575) (いずれも山形大学大学院理工学研究科・田中賢教授提供) を用いた。さらに、比較対照のための汎

用ポリマーとして、ポリエチレンテレフタレート (PET)、ポリブチレンテレフタレート (PBT)、ナイロン 6 (PA6) 及びナイロン 66 (PA66) (いずれも東レ株式会社製) を用いた。

また、ポリマーへの吸着挙動を解析するタンパク質として、血液凝固因子のひとつであるフィブリノーゲン (ヒト血漿由来) 並びに内因系血液凝固活性化リガンドであるフィブロネクチン (ヒト血漿由来) 及びビトロネクチン (ヒト血漿由来) (いずれも Sigma-Aldrich Co. LLC) を用いた。さらに、比較対照のためのタンパク質として、血清中に最も多く存在するタンパク質であるアルブミン (ヒト血清由来、Sigma-Aldrich Co. LLC) を用いた。

2. ポリマーコート QCM センサーの作製

PHEMA、PMEA 及び HEMA/MEA ランダム共重合のコーティングは、QCM センサー用の金電極付き水晶板をスピコートに設置し、ポリマーの 10 mg/mL メタノール溶液 20 μ L を滴下した。直ちに、500 rpm、5 sec (Step 1) 及び 2000 rpm、120 sec (Step 2) の条件でスピコートした後、室温で十分に乾燥させた。

PET、PBT、PA6 及び PA66 のコーティングは、金電極付き水晶板にポリマーの 5 mg/mL 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) 溶液 5 μ L を滴下し、過剰な HFIP 溶液を取り除いた後、室温で十分に乾燥させた。

ポリマーをコーティングした水晶板を水晶分離型センサーセルに設置し、電極表面が被験ポリマーでコーティングされた QCM センサーを作製した。

3. タンパク質吸着実験

ポリマーコート QCM センサーセルを分子間

相互作用解析装置 AFFINIX QN μ に設置し、センサーセルにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 490 μ L を加え、セル温度及び攪拌速度をそれぞれ 37°C 及び 600 rpm に設定し、QCM センサーが安定するのを待った。被験タンパク質の添加は、速度定数を求めるため、異なる濃度で複数の実験を行う緩和法で行った。すなわち、PBS を加えて安定したセンサーセルに、アルブミンの 400、800、1600、3200 μ g/mL PBS 溶液 (終濃度 8、16、32、64 μ g/mL)、フィブリノーゲン及びフィブロネクチンの 50、100、200、400 μ g/mL PBS 溶液 (終濃度 1、2、4、8 μ g/mL) 並びにビトロネクチンの 12.5、25、50、100 μ g/mL PBS 溶液 (終濃度 0.25、0.5、1、2 μ g/mL) を 10 μ L ずつ個別に添加し、水晶振動子の共振周波数を 1 sec ごとに測定した。

4. データ解析

緩和法による被験タンパク質の添加に伴う QCM センサーグラムから、データ解析ソフトウェア AQUA Version 2.0 (株式会社イニシウム) を用いて、センサーグラムのカーブフィティングによって得られた見かけの結合速度定数 (k_{obs}) と添加したタンパク質の終濃度との (1) の関係式で表される相関によってリニアフィティングし、被験ポリマー表面に吸着するタンパク質の結合速度定数 (k_{on}) 及び解離速度定数 (k_{off}) を求めた。さらに、(2) 及び (3) の関係式から被験ポリマー表面に吸着するタンパク質の結合定数 (K_a) 及び解離定数 (K_d) を求めた。

$$k_{obs} = k_{off} + k_{on} \cdot [\text{Guest}] \quad \text{----- (1)}$$

$$K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}} \quad \text{----- (2)}$$

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad \text{----- (3)}$$

C. 研究結果

1. コーティング量

QCM センサーのポリマーコーティング前後における共振周波数の差から、QCM センサーへのポリマーの有効コーティング量を算出した。メタノール溶液 (10 mg/mL) からスピンコーティングした PHEMA 及び PMEA の有効コーティング量は、それぞれ 29.2 \pm 9.5 及び 3.19 \pm 0.90 μ g/cm² であった (n=4)。また、HFIP 溶液 (5 mg/mL) からキャストコーティングした PET、PBT、PA6 及び PA66 の有効コーティング量は、それぞれ 7.72 \pm 0.47、11.5 \pm 0.7、16.2 \pm 1.0 及び 18.4 \pm 0.7 μ g/cm² であった (n=3)。

2. 吸着挙動

被験ポリマーに吸着するアルブミン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン及びビトロネクチンの各濃度における QCM センサーグラムから速度論的解析によって得られた (1) の関係式から結合速度定数 (k_{on}) 及び解離速度定数 (k_{off}) を算出し、さらに、(2) 及び (3) 式から結合定数 (K_a) 及び解離定数 (K_d) を算出した (表 1~4)。

いずれのタンパク質においても、結合定数及び結合速度定数は、汎用ポリマー (PET、PBT、PA6 及び PA66) より生体適合性ポリマー (PHEMA、PMEA 及び HEMA/MEA ランダム共重合) の方が小さく、解離定数及び解離速度定数は、汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が大きかった。特に、フィブロネクチン及びビトロネクチンにおいて、これらの傾向は顕著であった。

D. 考察

結合定数及び解離定数は相互作用に関する平衡定数である。すなわち、相互作用が進行して反応物（この場合、ポリマー表面に吸着していないタンパク質）が生成物（ポリマー表面に吸着したタンパク質）になる速度と生成物が反応物に解離する速度とが同じになり、巨視的にみて反応物と生成物の濃度変化が無くなった（タンパク質の吸着量が安定した）平衡状態に関するパラメータである。結合定数が大きいほど相互作用が強く、小さいほど相互作用が弱くなる。逆に解離定数は相互作用が強いほど小さく、相互作用が弱いほど大きくなる。しかし、これらのパラメータから反応（吸脱着）速度に関する議論は出来ず、速度に関して議論するためには、速度定数である結合速度定数及び解離速度定数を算出する必要がある。

高分子材料表面に吸着するタンパク質の網羅的比較定量解析から、材料の血液適合性を評価するためのマーカータンパク質の候補が選定された。すなわち、対照材料としたポリビニルピロリドン（PVP）含有ポリスルホン（PSF）、ポリエチレンテレフタレート（C-PET）、三酢酸セルロース（CTA）、未処理ポリスチレン（PS）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）及び超高分子ポリエチレン（UHMWPE）に対する血液凝固系タンパク質の吸着挙動を解析した結果、すべての材料表面上で顕著に濃縮されたセロトニントランスポーター、コラーゲン Type XXIIa、VN、インテグリン $\alpha 1$ 、リポタンパク質（APOE）及びホスホリパーゼ D₅ が血液適合性評価マーカーとして利用できる可能性が示唆された。また、PVP 含量の異なる PSF 及び組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体表面に吸着するヒト血漿タンパク質の網羅的比較定量解析を行い、前述の対照材料の解析結果と比

較検討した結果、内因系血液凝固活性化リガンドとして VN 及び FN、補体及び補体因子として C1r、C1s、C3、C5 及び FHR1、血液凝固因子として FA7、FA9、FA12 及びフィブリノーゲン β 鎖（FIBB）並びにその他のタンパク質として GPX3 及び PLD5 が血液適合性評価マーカー候補タンパク質として選定された。さらに、これらの血液適合性評価マーカー候補タンパク質を LC-MS/MS 装置を使用した SRM モードにより絶対定量を行った結果、FA7、FA9、C1s、フィブロネクチン及びビトロネクチンが血液適合性評価マーカーとして利用できることが確認された。FA12、FIBB、C1r 及び GPX3 も評価マーカーとして利用可能であるが、一部の対照材料が生体適合性に優れた材料と近似する吸着挙動を示した。一方、C3、C5、FHR1 及び PLD5 は、評価マーカーとして不適であることが判明した。

我々は、血液適合性ポリマーである PHEMA、PMEA 及び組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体（PHM7525、PHM5050 及び PHM2575）並びに汎用ポリマーである PET、PBT、PA6 及び PA66 でコーティングされた QCM センサーを作製し、これらのポリマー表面に対するアルブミン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン及びビトロネクチンの吸着挙動を解析した。

いずれのタンパク質においても、結合定数及び結合速度定数は汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が小さく、これらのタンパク質は生体適合性ポリマーに吸着しにくい。一方、解離定数及び解離速度定数は汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が大きく、これらのタンパク質は生体適合性ポリマーから解離しやすい。フィブロネクチン及びビトロネクチンにおいてこれらの傾向は顕著で、フィブロネクチン及びビトロネクチンの吸着挙動から血液適合性をスクリーニングするこ

とができそうである。今後、ポリマーの種類をさらに増やして検証するとともに、血液適法性のスクリーニング法として利用するためには試験条件の最適化が求められる。

E. 結論

ポリマー等に対する血液適合性評価マーカー候補タンパク質の吸着挙動を動力的に解析するため、電極表面が血液適合性ポリマーである PHEMA、PMEA 及び組成比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体 (PHM7525、PHM5050 及び PHM2575) 並びに汎用ポリマーである PET、PBT、PA6 及び PA66 でコーティングされた QCM センサーを作製した。QCM 法により、これらのポリマー表面に対するアルブミン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン及びビトロネクチンの吸着に伴う平衡定数及び速度定数を求めた。その結果、いずれのタンパク質においても、結合定数及び結合速度定数は、汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が小さく、解離定数及び解離速度定数は、汎用ポリマーより生体適合性ポリマーの方が大きかった。特に、フィブロネクチン及びビトロネクチンにおいて、これらの傾向は顕著であった。フィブロネクチン及びビトロネクチンの吸着挙動からポリマーの血液適合性をスクリーニングできる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 河上強志、伊佐間和郎、五十嵐良明：EU おける繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の違反事例の特徴、国立医薬品食品衛生研究所報告、131、66-74 (2013)

- 2) 味村真弓、中島晴信、吉田仁、吉田俊明、河上強志、伊佐間和郎：有害物質含有家庭用品規制法で規制されている繊維製品中のトリス(2,3-ジブロモプロピル)ホスフェイト分析法の改定に向けた検討、薬学雑誌、134、259-268 (2014)
- 3) Yuji Haishima, Tsuyoshi Kawakami, Chie Hasegawa, Akito Tanoue, Toshiyasu Yuba, Kazuo Isama, Atsuko Matsuoka, Shingo Niimi: Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 102, 721-728 (2014)
- 4) 伊佐間和郎：ナノマテリアルの in vitro 安全性評価のための基礎研究—金属酸化ナノ粒子に対する細胞応答—、薬学雑誌、134、731-735 (2014)
- 5) Tsuyoshi Kawakami, Kazuo Isama, Yoshiaki Ikarashi: Analysis of isothiazolinone preservatives in polyvinyl alcohol cooling towels used in Japan, Journal of Environmental Science and Health, Part A, 49, 1209-1217 (2014)
- 6) 河上強志、伊佐間和郎、五十嵐良明：イソチアゾリノン系防腐剤による接触皮膚炎 - 家庭用品に起因する症例を中心として、Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology、8、147-161 (2014)

- 7) Yuji Haishima, Chie Hasegawa, Yusuke Nomura, Tsuyoshi Kawakami, Toshiyasu Yuba, Tomoko Shindo, Keisuke Sakaguchi, Takahiro Tanigawa, Kaori Inukai, Mika Takenouchi, Kazuo Isama, Atsuko Matsuoka, Shingo Niimi: Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102, 1809-1816 (2014)
- 8) 河上強志、伊佐間和郎、五十嵐良明：繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の高速液体クロマトグラフィーを用いた確認試験に関する検討、*国立医薬品食品衛生研究所報告*、132、57-66 (2014)
- 9) Tsuyoshi Kawakami, Kazuo Isama, Yoshiaki Ikarashi: Analysis of 19 preservatives in polyvinyl alcohol cooling towels used in Japan by high performance liquid chromatography with photo diode array detector, *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2, 122 (2015)
- 10) Yuji Haishima, Tsuyoshi Kawakami, Chie Fukui, Akito Tanoue, Toshiyasu Yuba, Satoru Ozono, Hidehito Kumada, Kaoru Inoue, Tomomi Morikawa, Miwa Takahashi, Ayano Fujisawa, Kayo Yamazaki, Yusuke Nomura, Kazuo Isama, Yuichi Tei, Kumiko Ogawa, Shingo Niimi, Midori Yoshida: Characterization of alternative plasticizers in polyvinyl chloride sheets for blood containers, *Journal of Vinyl and Additive Technology*, in press
2. 学会発表
- 1) Rumi Sawada, Ken Kono, Kazuo Isama, Yuji Haishima, Atsuko Matsuoka: The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting* (2013.6, Boston)
- 2) Kazuo Isama, Tsuyoshi Kawakami, Atsuko Matsuoka: Surface characteristics and apatite-forming ability of calcium-incorporating titanium, *25th European Conference on Biomaterials* (2013.9, Madrid)
- 3) 伊佐間和郎、河上強志、松岡厚子：カルシウム導入したチタンの表面特性とアパタイト形成能、第35回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11、江戸川区)
- 4) 野村祐介、河上強志、福井千恵、柚場俊康、新藤智子、坂口圭介、谷川隆洋、犬飼香織、竹ノ内美香、伊佐間和郎、松岡厚子、新見伸吾、齋島由二：溶血性試験用陽性対照材料 Genapol X-080 含有 PVC シートの性能評価、第35回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11、江戸川区)
- 5) 齋島由二、福井千恵、山崎佳世、野村祐介、小園知、熊田秀文、藤澤彩乃、井上薫、森川朋美、市村亮平、前田潤、高橋美和、河上強志、伊佐間和郎、柚場俊康、浜田信城、鄭雄一、小川久美子、新見伸吾、吉田緑：DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発 - ラット精巢に及ぼす DOTP の影響評価 - 、日本薬学会第134年会 (2014.3、熊本市)

- 6) Kazuo Isama, Tsuyoshi Kawakami, Atsuko Miyajima: Characteristics and cytotoxic effects of nanoparticles when coexisting with metal salts, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (2014.9, Edinburgh)
- 7) 伊佐間和郎、河上強志、新見伸吾：血液適合性材料に吸着するタンパク質の動力学的解析、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11、江戸川区)
- 8) 配島由二、福井千恵、山崎佳世、野村祐介、小園知、熊田秀文、藤澤彩乃、井上薫、森川朋美、市村亮平、前田潤、高橋美和、河上強志、伊佐間和郎、柚場俊康、鄭雄一、小川久美子、新見伸吾、吉田緑：新規血液バッグ用代替可塑剤 DOTH のラット亜慢性毒性試験、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11、江戸川区)
- 9) 配島由二、河上強志、福井千恵、田上昭人、柚場俊康、向井智和、野村祐介、伊佐間和郎、新見伸吾：新規血液バッグ素材 DOTH/DINCH 配合 PVC シートの性能評価、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11、江戸川区)
- 10) Atsuko Miyajima-Tabata, Tsuyoshi Kawakami, Kaoru Komoriya, Reiko Kato, Shingo Niimi, Kazuo Isama: Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells, The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3, San Diego)
- 11) 伊佐間和郎、河上強志、五十嵐良明：亜リン酸エステル系酸化防止剤の細胞毒性及び皮膚感作性、日本薬学会第 135 年会 (2015.3、神戸市)
- 12) 配島由二、福井千恵、野村祐介、藤澤彩乃、山崎佳世、熊田秀文、井上薫、森川朋美、高橋美和、河上強志、伊佐間和郎、柚場俊康、宮崎謙一、鄭雄一、小川久美子、新見伸吾、吉田緑：PVC 製血液バッグに適用可能な新規可塑剤 NJC-NP の毒性評価、日本薬学会第 135 年会 (2015.3、神戸市)
3. その他
- 1) 伊佐間和郎：「体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件」、第 4 章第 3 節 金属系材料の細胞毒性の評価、技術情報協会、東京、pp.303-307 (2013)

表1 アルブミンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of albumin			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PHEMA	1.28E+06	7.84E-07	1.50E+03	1.18E-03
PHM7525	1.31E+06	7.64E-07	1.51E+03	1.15E-03
PHM5050	1.26E+06	7.93E-07	1.49E+03	1.18E-03
PHM2575	1.30E+06	7.68E-07	1.52E+03	1.17E-03
PMEA	1.33E+06	7.54E-07	1.51E+03	1.14E-03
PET	1.21E+08	8.27E-09	4.80E+04	3.97E-04
PBT	1.30E+08	7.69E-09	3.21E+04	2.47E-04
PA6	4.24E+07	2.36E-08	1.47E+04	3.47E-04
PA66	2.94E+07	3.40E-08	1.41E+04	4.79E-04

表2 フィブリノーゲンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of fibrinogen			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PHEMA	2.49E+07	4.01E-08	2.37E+04	9.49E-04
PHM7525	2.23E+07	4.48E-08	2.26E+04	1.01E-03
PHM5050	2.20E+07	4.54E-08	2.29E+04	1.04E-03
PHM2575	2.01E+07	4.97E-08	2.18E+04	1.08E-03
PMEA	1.24E+07	8.05E-08	1.85E+04	1.49E-03
PET	1.75E+09	5.70E-10	2.84E+05	1.62E-04
PBT	1.46E+09	6.87E-10	2.62E+05	1.80E-04
PA6	5.25E+08	1.91E-09	9.71E+04	1.85E-04
PA66	5.48E+08	1.82E-09	8.39E+04	1.53E-04

表 3 フィブロンネクチンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of fibronectin			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PHEMA	6.02E+06	1.66E-07	1.78E+04	2.96E-03
PHM7525	5.71E+06	1.75E-07	1.74E+04	3.05E-03
PHM5050	5.23E+06	1.91E-07	1.60E+04	3.07E-03
PHM2575	5.34E+06	1.87E-07	1.65E+04	3.09E-03
PMEA	5.03E+06	1.99E-07	1.56E+04	3.09E-03
PET	8.52E+08	1.17E-09	2.96E+05	3.47E-04
PBT	1.13E+09	8.83E-10	3.46E+05	3.06E-04
PA6	4.75E+09	2.11E-10	2.17E+05	4.57E-05
PA66	2.91E+09	3.43E-10	1.74E+05	5.97E-05

表 4 ビトロネクチンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of vitronectin			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PHEMA	2.42E+07	4.13E-08	2.27E+04	9.37E-04
PHM7525	2.46E+07	4.06E-08	2.00E+04	8.12E-04
PHM5050	2.53E+07	3.96E-08	2.11E+04	8.35E-04
PHM2575	2.62E+07	3.82E-08	2.07E+04	7.91E-04
PMEA	2.59E+07	3.86E-08	2.01E+04	7.75E-04
PET	4.10E+10	2.44E-11	1.25E+06	3.05E-05
PBT	4.71E+10	2.12E-11	1.49E+06	3.16E-05
PA6	2.07E+10	4.84E-11	9.21E+05	4.46E-05
PA66	1.77E+10	5.66E-11	9.14E+05	5.18E-05

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

研究分担者 石原 一彦 東京大学大学院工学系研究科・教授

研究要旨

タンパク質吸着現象には、材料表面における水分子のネットワーク構造(水和構造)と材料表面近傍で働く分子間相互作用(表面相互作用)が強く関与する。本研究では、材料表面におけるこれら二つの特性がタンパク質吸着挙動に果たす役割を定量的に解析することを目的とする。このような微細な特性を正確に解析するために、構造が明確であると同時に、広範囲にわたり界面科学的特性を制御できる高密度ポリマーブラシ構造を、ポリマー表面のモデルとして一貫して使用する。表面特異的な水和構造を解析するため、マイクロオーダーのシリカ粒子を用いてナノオーダーの微小空間を構築し、そこに封入された水分子の特性を核磁気共鳴法により高い時間分解能で評価する方法論の確立を行った。これにより、シリカ粒子表面を覆ったポリマーブラシ層の特性に強く影響されたナノ間隙水の磁気緩和時間や自己拡散係数を定量的に評価した。また、分子間もしくは表面相互作用力を解析するため、様々な分子を固定化したプローブと材料表面間にナニュートンオーダーで働く相互作用力を原子間力顕微鏡(AFM)のフォースカーブ測定により定量する方法論の確立を行った。これにより、様々な分子と材料表面間に働く相互作用力が、タンパク質吸着挙動に与える影響について評価した。このような解析を通してタンパク質吸着挙動を正確に理解することで、医療機器開発に関する規制環境の整備に貢献する。

A. 研究目的

バイオマテリアルが生体環境と接した際に誘起される細胞レベルの初期生体反応の多くに吸着タンパク質層の特性が関連している。つまり、材料表面における生体反応を高度に規定し、医療機器開発に関する規制環境を整備するためには、タンパク質吸着過程を正確に把握することが必要不可欠である。材料表面の吸着タンパク質層は、タンパク質が材料表面と直接相互作用して形成される単層吸着層と、単層吸着層を形成するタンパク質の変性等を引き金として起こる多層吸着層から形成される。このよ

うなタンパク質吸着層の成り立ちから、タンパク質吸着過程を正確に理解するためには、材料表面における吸着タンパク質の量、組成、分布、コンフォメーション、配向などの静的な特性評価はもとより、タンパク質の競争的吸着や吸着後の変性過程などに関わる動的な特性の解析が重要である。しかしながら、タンパク質吸着の動的特性は、静的特性の経時的変化として解析されることが多く、水を媒体として作用し、タンパク質の溶存状態での高次構造の維持、材料表面へのタンパク質吸着や吸着タンパク質のコンフォメーション変化に大きな影響を

与える分子間相互作用の観点からは明確にされていない。

そこで本研究では、材料表面における水分子のネットワーク構造(水和構造)と材料表面近傍で働く分子間相互作用(表面相互作用力)が、タンパク質吸着挙動に与える影響を定量的に解析することを目的とする。

材料表面における水和構造や表面相互作用力は非常に微細である。つまり、これらを定量的に分析するためには構造明確な表面が必要不可欠である。本研究では、構造が明確であると同時に、広範囲にわたり界面科学的特性を制御できる高密度ポリマーブラシ構造を、ポリマー表面のモデルとして一貫して使用する。

表面特異的な水和構造を解析するため、マイクロオーダーのシリカ粒子を用いてナノオーダーの微小空間を構築し、そこに封入された水分子の特性を核磁気共鳴法により高い時間分解能で評価する方法論の確立を行った。これにより、シリカ粒子表面を覆ったポリマーブラシ層の特性に強く影響されたナノ間隙水の磁気緩和時間や自己拡散係数を定量的に評価した。また、分子間もしくは表面相互作用力を解析するため、現在界面科学の研究分野で大きな発展を遂げているコロイドプローブ科学に着目し、様々な分子を固定化したプローブと材料表面間にナニュートンオーダーで働く相互作用力を原子間力顕微鏡(AFM)のフォースカーブ測定により定量する方法論の確立を行った。これにより、様々な分子と材料表面間に働く相互作用力が、タンパク質吸着挙動に与える影響について評価した。

B . 研究方法

1. ポリマーブラシ表面の構築

シリコン基板、シリカ粒子(直径：2、10 または 20 μm)および金表面に原子移動ラジカル重合(ATRP)の開始基を固定した後、表面開始型 ATRP (SI-ATRP)法を用いて、図 1 に示すポリマーブラシ構造を構築した。ポリマーブラシ構造を構築する際のモノマー濃度とフリー重合開始剤の比を制御することで、種々の分子量を有するグラフト鎖からなるポリマー層を表面に構築した。ここで、双性イオン性モノマーとして、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) (ホスホベタイン型)、*N*-methacryloyloxyethyl *N,N*-dimethyl ammonium- α -*N*-methyl carboxylate (CBMA) (カルボキシベタイン型)および [2-(methacryloyloxy) ethyl] dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide (SBMA) (スルホベタイン型)を、非電解質親水性モノマーとして 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) (ヒドロキシル基)および oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (mOEGMA) (オリゴエチレングリコール鎖)を、カチオン性モノマーとして、2-trimethylammoniumethyl methacrylate (TMAEMA) (トリメチルアンモニウム基)を、アニオン性モノマーとして、3-sulfopropyl methacrylate (SPMA) (スルホプロピル基)を、疎水性モノマーとして、*n*-butyl methacrylate (BMA) (ブチル基)をそれぞれ用いた。

作製したポリマーブラシ表面の物理化学的な構造を X 線光電子分光(XPS)測定、原子間力顕微鏡(AFM)および分光エリブソメーターにより評価した。水中の表面特性評

価として、動的接触角測定および表面ゼータ電位測定(10 mmol/L の NaCl 水溶液中)を行った。

2. 水和構造解析

様々な膜厚のポリマーブラシ構造を構築したシリカ粒子(直径: 2 または 10 μm)を NMR 管に詰めた後、脱気した純水を加え、ポリマーブラシ層を水和させた。サンプルによっては 3500 rpm で 10 分間遠心し、シリカ粒子を充填させた。このように調製した NMR チューブを NMR 装置に設置し、37°C に保持した後、サンプルに含まれる水分子のスピン - 格子緩和時間(T1)および自己拡散係数(D)を測定した。

3. ポリマーブラシ表面近傍の表面相互作用力測定

図 1 に示したポリマーブラシ層のうち、poly(MPC)、poly(TMAEMA)、poly(SPMA) および poly(BMA) ブラシ表面を構築した直径 20 μm のシリカ粒子をプローブレスカンチレバーの先端に手動で固定化した。カンチレバー先端に存在するポリマーブラシ層と同じポリマーブラシ層をシリコン基板表面に構築し、様々な塩濃度の水環境下において両者の間に生じるフォースカーブ曲線を取得した。

4. タンパク質吸着量の定量

水晶振動子マイクロバランス(QCM-D)を用いて、ポリマーブラシ表面に対するタンパク質吸着量を定量した。ポリマーブラシ層を構築した金センサー基板を QCM-D 装置に設置後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH 7.4)を用いてベースラインを測定した。

45 mg/mL の濃度に調製されたウシ血清アルブミン(BSA)の PBS 溶液を 30 分間接触させた後、センサー表面を PBS で洗浄した。タンパク質溶液との接触前後の振動数変化をタンパク質吸着量とし、「タンパク質吸着量(ng/cm^2) = 17.7 x 振動数変化(Hz)」の変換式を用いて定量的にタンパク質吸着量を評価した。

5. 官能基との直接的な相互作用

3 に示した方法により、プローブレスカンチレバーの先端に直径が 20 μm の未修飾シリカ粒子を手動で固定化し、そこに接着層としてクロムを 3.0 nm、続いて金薄膜を 27 nm スパッタした。同カンチレバー表面に、11-mercapto-undecanoic acid、11-amino-1-undecanethiol (hydrochloride)、および 1-dodecanethiol のエタノール溶液(1.0 mmol/L)を用いて、それぞれカルボキシル基、アミノ基およびメチル基末端の自己組織化単分子(SAM)膜を形成した。室温の PBS 中におけるフォースカーブ測定により、各ポリマーブラシ表面に対する離脱時のフォースカーブを取得した。

6. タンパク質との直接的 / 間接的な相互作用評価

各ポリマーブラシ表面に関して、タンパク質との直接的 / 間接的な相互作用を評価した。タンパク質として、ウシ血清アルブミン(BSA)およびニワトリ卵白由来リゾチーム(Lys)を使用し、これらのタンパク質を化学的に固定化したカンチレバー(曲率半径: 50 nm)を作製した。室温の PBS 中におけるフォースカーブ測定により、各ポリ

マーブラシ表面に対する接近および離脱時のフォースカーブを取得した。

(倫理面への配慮)

本研究は、合成高分子やタンパク質を使用するものであるため、倫理面に関して特段の配慮は不要であると判断した。

C. 研究結果およびD. 考察

1. ポリマーブラシ表面の構造および特性

得られたポリマーブラシ表面の XPS チャートに、各モノマーユニットに特異的な元素ピークが検出された。また、ポリマーブラシ表面は乾燥状態で比較的小さい凹凸構造であり、表面粗さの指標である RMS 値は 1.0 nm 以下であった。表 1 に示すように、エリプソメトリーによる乾燥膜厚解析から、各ポリマーブラシ表面のグラフト密度はすべて 0.10 chains/nm² 以上であった。グラフト密度とポリマー鎖の断面積から概算した表面被覆率は、すべての表面において 30% を超え、非常に高い値とあった。これらの結果は、作製されたポリマーブラシ基板が高密度領域にあることを示した。

表 1 には、膜厚が 5.0 nm 程度の各ポリマーブラシ表面の動的接触角および表面電位も併記した。Poly(BMA) を除くポリマーブラシ基板の後退接触角は低い値を示し、水中で高い親水性を示すことがわかった。表面電位に関しては、カチオン性の poly(TMAEMA) ブラシ層が 40 mV を超える表面電位を示し、アニオン性の poly(SPMA) ブラシ層は強い負電荷を持つ表面であった。一方、非イオン性およびスルホベタイン構造のポリマーブラシ表面が -10 mV 程度と多少アニオン性であった。弱

酸 - 弱塩基の組み合わせからなるホスホベタインやカルボキシベタイン構造を有するポリマーブラシ表面はほぼ中性であった。

このように、高密度ポリマーブラシ層により、均一な構造を有し、ポリマー鎖の配置がナノメートルオーダーで明確である表面を構築した。また、様々な化学構造を有するグラフト鎖を配置することで、濡れ性や表面電位などに代表される界面科学的な表面特性を広範囲に制御した。

2. 水和構造解析

図 2 に膜厚が 5.0 nm 程度のポリマーブラシ層近傍の水分子の自己拡散定数を示す。水分子の運動性に対応する自己拡散係数は、カチオン性の poly(TMAEMA) ブラシ表面およびアニオン性の poly(SPMA) ブラシ表面のイオン性ポリマーブラシ表面で非常に小さい値となった。つまり、これらの表面では水分子がポリマー鎖と強く相互作用し、その運動性が抑制されていることが示唆された。非イオン性の poly(HEMA) ブラシ表面の水分子は、今回のポリマーブラシ表面の中で最大の自己拡散係数を示した。ここで、poly(HEMA) ブラシ表面は、そのポリマー鎖が非水溶性であるという点で他の水溶性ポリマーブラシ表面と異なる。このため、poly(HMEA) ブラシ近傍の水和様式は他と異なると考えられる。水溶性ポリマーブラシ表面の中で、オリゴエチレングリコール鎖を有する poly(mOEGMA) ブラシ表面や双性イオン性のポリマーブラシ表面の水分子は、大きな自己拡散定数を有しており、水分子が高い運動性を有することがわかった。これは適度な水素結合性水和やイオン性水和、疎水性水和が影響を与えてい

ると考えられる。

間隙に封入された水は、ポリマーブラシ層内部の水、ポリマーブラシ層最表面付近の水、およびポリマーブラシ層と相互作用していない水からなると考えられる。重合度が 50 から 200 の範囲で作製したポリマーブラシ層の厚さは 5 から 20 nm 程度であるが、直径が 10 μm のシリカ粒子が形成する間隙のサイズは最大で 800 nm である。これは、間隙内に封入された水分子の大部分が表面に存在するポリマー鎖と相互作用しない自由水であることを意味する。このため、現状では 3500 ms 程度の T1 値を有する純水の影響を強く受け、T1 値が大きく見積もられる可能性がある。このような事態を解決するため、シリカ粒子の直径を変化させたり、遠心を利用しシリカ粒子のパッキングを密にしたり、またはブラシ層の厚さを変化させたりするなどの改変が今後必要であると考えられる。

3. ポリマーブラシ表面近傍の表面相互作用力測定

図 3 に、純水およびイオン強度が異なる PBS (1.5 mmol/L および 150 mmol/L) 中において、同種のポリマーブラシ表面の接近時のフォースカーブを示す。ただし、poly(BMA)表面に関しては、接近時および離脱時のフォースカーブを示す。カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA) ブラシ表面およびアニオン性の側鎖を有する poly(SPMA) ブラシ表面では、純水中において 100 nm 以上の距離から強い斥力が観測され、溶液のイオン強度の増加に伴い斥力の強さと伝播距離が低下した。これは、これらの斥力が主として静電的な力、つまり

静電的相互作用に由来するものであることを示している。また、疎水性の側鎖を有する poly(BMA) ブラシ表面では、純水中において接近時には力が観測されなかったが、接触後、離脱時のみに強い引力が観測された。この引力は水中で疎水性表面間に働く疎水性相互作用に起因するものであると考えられる。また、図 4 に示す離脱時のフォースカーブから、カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA) ブラシ表面およびアニオン性の側鎖を有する poly(SPMA) 表面には、poly(BMA) ブラシ層で検出された離脱時の強い引力が検出されなかった。一方、双性イオン性の側鎖を有する poly(MPC) ブラシ表面では、このような特徴を示すフォースカーブが観察されなかった。すなわち、静電的・疎水的な相互作用に由来する力は全く観測されなかった。

これらの結果から、カチオン性およびアニオン性ポリマーブラシ表面には、静電的相互作用のみが、疎水性ポリマーブラシ表面には疎水性相互作用のみが働き、双性イオン性ポリマーブラシ表面にはこのような相互作用が全く働いていないことが明らかとなった。

4. タンパク質吸着量

図 5 に、ポリマーブラシ表面への BSA の吸着量の定量結果を示す。双性イオン型ポリマーブラシ表面には 20 から 40 ng/cm^2 程度のタンパク質が吸着した。非イオン型ポリマーブラシ表面の中で、poly(HEMA) ブラシ表面には 80 ng/cm^2 程度のタンパク質が吸着したが、poly(mOEGMA) ブラシ表面は 20 ng/cm^2 程度のタンパク質吸着量であった。BSA の理論単層吸着量は 270

ng/cm²程度である。このことから、双性イオン性および非イオン性ポリマーブラシ表面は BSA の吸着が単層以下に抑制されたことがわかった。一方、イオン性ポリマーブラシ表面のタンパク質吸着量は、アニオン性の側鎖を有する poly(SPMA)ブラシ表面で 290 ng/cm²程度であり、カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA)ブラシ表面で 1200 ng/cm²に達した。つまりアニオン性表面には単層の、カチオン性表面には多層のタンパク質吸着層が形成された。BSA が生理条件下で負に帯電していることから、カチオン性ポリマーブラシ表面との静電的な相互作用により多層吸着層が形成されたと考えられる。

5. タンパク質との直接的 / 間接的な相互作用評価

図 6 にポリマーブラシ表面とタンパク質との間の代表的なフォースカーブを、図 7 に離脱時のフォースカーブから得られる直接的相互作用力を示す。ここでは、生理条件下でそれぞれ全体として、負の正味電荷を有するタンパク質である BSA に加えて、正の正味電荷を有する Lys を用いた。図 7 に示すように、ポリマーブラシ表面とタンパク質との相互作用は、その組み合わせにより大きく異なった。BSA との相互作用はカチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA)ブラシ表面で最大であった。これは、poly(TMAEMA)表面の正電荷と BSA の有する負電荷との間の静電的な引力に起因すると考えられる。また、アニオン性の側鎖を有する poly(SPMA)ブラシ表面に対する BSA の相互作用は小さかった。これは、負電荷同士の斥力に起因する

と考えられる。一方、正の正味電荷を有する Lys は、疎水性の側鎖およびアニオン性の電位を有する poly(BMA)ブラシ表面と強く相互作用した。しかしながら、Lys と poly(SPMA)との相互作用は非常に小さかった。この理由は現時点では明らかではないが、塩強度の強い PBS 中にて、溶液中に存在するイオンにより静電的な相互作用が遮蔽されていることが考えられる。タンパク質の正味電荷に関わらず、双性イオン性の側鎖を有する poly(MPC)ブラシ表面はタンパク質との相互作用が非常に小さかった。

双性イオン性および非イオン性ポリマーブラシ表面に関して、BSA の吸着量および吸着力の関係を図 8 に示す。図 8 より、タンパク質吸着力の減少に伴い、タンパク質吸着量が減少した。つまり、単層以下の吸着量は、表面とタンパク質との直接的な相互作用により決まることが示唆された。一方、多層吸着層が形成したイオン性表面は図 8 に示す相関から外れた。これは、吸着力が表面との直接的な相互作用を評価するのに対して、吸着量は表面に吸着したすべてのタンパク質を評価することに起因すると考えられる。これらに関してより詳細かつ系統的な解析を行うためには、タンパク質をあらかじめ吸着させた基板とタンパク質との相互作用解析などが必要不可欠である。

図 6 に示すフォースカーブのうち、接近時のフォースカーブに着目すると、ほとんどの組み合わせで、タンパク質とポリマーブラシ表面との間に引力を観測することはなかった。すなわち、これらの表面における静電的あるいは疎水的な相互作用はタンパク質を引き付ける駆動力としてではなく、

接触後の離脱を妨げる力として働いていることが明らかとなった。

6. ポリマーブラシ表面と官能基との直接的相互作用

様々な官能基により修飾されたプローブを用いてフォースカーブ測定を行い、ポリマーブラシ表面と官能基との間に働く相互作用を定量的に評価した(図 9)。選択した官能基はカルボキシル(COOH)基、アミノ(NH₂)基およびメチル(CH₃)基であり、これらはタンパク質中に多く存在する代表的な官能基であると同時に、それぞれアニオン性、カチオン性および疎水性の特性を有するため、静電的相互作用や疎水性相互作用の指標になると考えられる。双性イオン性の側鎖を有する poly(MPC) ブラシ表面はいずれの官能基との相互作用も極めて小さかった。この結果から、poly(MPC) ブラシ表面では静電的相互作用や疎水性相互作用に由来する力がほとんど働かないことが示唆される。また、水中の気泡の接触角および表面電位から、これらの表面が水環境下において高い親水性かつ電気的に中性を有する表面であったこととも一致する。カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA) ブラシ表面はカルボキシル基との特に強い相互作用を示した。これは、poly(TMAEMA)の側鎖に存在する正電荷と、解離したカルボキシル基(COO⁻)の負電荷との間に強い静電的引力が働いていることを示す。疎水性の側鎖を有する poly(BMA) ブラシ表面はメチル基およびアミノ基との強い相互作用を示した。メチル基との強い相互作用は、水中において働く疎水性相互作用に由来すると考えられる。同時に表 1 に示したように、

poly(BMA) ブラシ表面はアニオン性であったため、プロトン化したアミノ基(NH₃⁺)の正の電荷との間の静電的相互作用に由来する力が働いたと考えられる。一方で、アニオン性の側鎖を有する poly(SPMA) ブラシ表面は PBS 中ではいずれの官能基との相互作用も示さなかった。しかしながら、純水中においては poly(SPMA) ブラシ表面とアミノ基との強い相互作用が観測された。このため、poly(SPMA) 表面では、塩強度の強い PBS 中において、静電的相互作用が静電遮蔽の効果を受けているものと考えられる。以上のように、様々な官能基で修飾されたプローブを用いたフォースカーブ測定により、ポリマーブラシ表面に働く分子間相互作用の一部を定量的に明らかとした。

バイオマテリアル表面における官能基レベルの相互作用が、タンパク質との相互作用に与える影響を定量的に評価することは、タンパク質吸着挙動のさらなる理解へと繋がる。図 10 に、ポリマーブラシ表面におけるタンパク質の相互作用と官能基との相互作用の総和との関係を示す。図 10 より、官能基との相互作用の総和が小さいポリマーブラシ表面と大きいポリマーブラシ表面に分けることができる。官能基との相互作用の総和が小さいポリマーブラシ表面は、タンパク質の正味電荷によらず、タンパク質との相互作用が小さいことが示された。一方、官能基との相互作用の総和が大きいポリマーブラシ表面では、同等の総和であってもポリマーブラシ表面とタンパク質との組み合わせにより、その関係が大きく変化した。つまり、負電荷の乖離カルボキシル(COO⁻)基と強く相互作用する poly(TMAEMA) ブラシ表面は、負の正味電

荷を有する BSA と強く相互作用し、疎水性のメチル基および正電荷のプロトン化アミノ(NH₃⁺)基と強く相互作用する poly(BMA) ブラシ表面は、正の正味電荷を有する Lys と相互作用した。これは、突出した相互作用を有する官能基との相互作用が、タンパク質との相互作用を決定することを示唆する結果である。このような結果から、タンパク質との非特異的な相互作用を排除するためには、官能基レベルの相互作用を回避する必要があることが示された。

E . 結論

構造明確かつ広範囲にわたる表面特性を有するポリマーブラシ構造を用いることで、表面特異的な水和構造および表面相互作用力がタンパク質吸着挙動に与える影響を解析した。イオン性のポリマーブラシ表面には静電的相互作用のみが、疎水性のポリマーブラシ表面には疎水性相互作用のみが働き、双性イオン性ポリマーブラシ表面にはこのような相互作用が働いていないことが明らかとなった。加えて、イオン性ポリマーブラシ表面近傍の水分子はその運動性が著しく抑制されていることがわかった。表面に働く相互作用は、タンパク質を引き付ける駆動力としてではなく、接触後の離脱を妨げる力として働いていることが明らかとなった。また、官能基レベルの相互作用が、タンパク質との相互作用に直結していることがわかった。さらに、タンパク質と表面との間に働く相互作用がタンパク質の吸着量と相関することが示された。以上より、タンパク質の離脱時の分子間相互作用を誘起しない表面の設計がタンパク質吸着の抑制に重要であることが定量的に明らかとなった。

F . 研究発表

1. 論文発表

○Kazuomi Inoue, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Effects of dynamics of water molecules at hydrophilic polymer brush surfaces on protein adsorption behavior", *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* 37(3) 333-336 (2012).

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Quantitative Evaluation of Interaction Force between Functional Groups in Protein and Polymer Brush Surfaces", *Langmuir*, 30, 2745-2751, (2014) ([dx.doi.org/10.1021/la404981k](https://doi.org/10.1021/la404981k)).

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Nano-scale Molecular Interaction Force Measurement for Analysis of Protein Adsorption on the Surfaces", *Trans. Mat. Res. Soc. Japan* 39[2] 185-188 (2014).

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Molecular Interaction Forces Generated during the Protein Adsorption to Well-defined Polymer Brush Surfaces", *Langmuir*, in press (2015) ([dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00351](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00351)).

2. 学会発表

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Interaction forces related to protein adsorption on polymer brush surfaces", *The Society For Biomaterials 2013 Annual Meeting and Exposition: Biomaterials Revolution*, Boston, USA, 2013/4/10-13.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「種々の力が作用するポリマーブラシ表面へのタンパク質の吸着挙動」、第 62 回高分子学会年次大会、京都、2013/5/29-31.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質非吸着を実現する表面相互作用力の定量解析」、第 62 回高分子討論会、金沢、2013/9/11-13.

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Nano-force Analysis for Understanding Protein-Materials Interactions", 2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013, Tokyo, Japan, 2013/10/8-10.

○井上祐貴、坂田翔、石原一彦、「タンパク質吸着の AFM ナノフォース解析」、第 35 回バイオマテリアル学会大会、東京、2013/11/25-26.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質吸着の理解を目指したナノスケールの相互作用力解析手法の確立」、第 23 回日本 MRS 年次大会、横浜、2013/12/9-11.

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Surface Interaction Forces Governing Protein Adsorption Analyzed by Direct Force Measurement", The Society For Biomaterials 2014 Annual Meeting and Exposition: Pioneering the Future of Biomaterials, Denver, USA, 2014/4/16-19.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「表面で観測される力の解析に基づくタンパク質非吸着表面の創製」、第 63 回高分子学会年次大会、名古屋、2014/5/28-30.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパ

ク質吸着における分子間相互作用力の役割」、第 43 回医用高分子シンポジウム、東京、2014/7/28-29.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「ポリマー表面における分子間相互作用力の精密解析とタンパク質吸着プロセスの理解」、第 63 回高分子討論会、長崎、2014/9/24-26.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「種々の分子間相互作用力に基づくタンパク質吸着プロセスの理解」、第 36 回バイオマテリアル学会大会、東京、2014/11/17-18.

○井上祐貴、石原一彦、「マテリアル表面近傍の水和構造がタンパク質との相互作用に与える影響」、第 36 回バイオマテリアル学会大会、東京、2014/11/17-18.

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Analysis of protein adsorption force generated at polymer surfaces for designing non-biofouling surfaces", The 10th International Polymer Conference, Tsukuba, Japan, 2014/12/2-5.

○Kazuhiko Ishihara, Sho Sakata, Yuuki Inoue, "Nanoforce measurements for understanding protein adsorption at the biocompatible surface", 8th International Symposium on Nanomedicine, Matsuyama, Japan, 2014/12/4-6.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質吸着プロセスの理解を目指した分子間相互作用力の解析」、第 24 回日本 MRS 年次大会、横浜、2014/12/10-12.

G . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

なし

3.その他

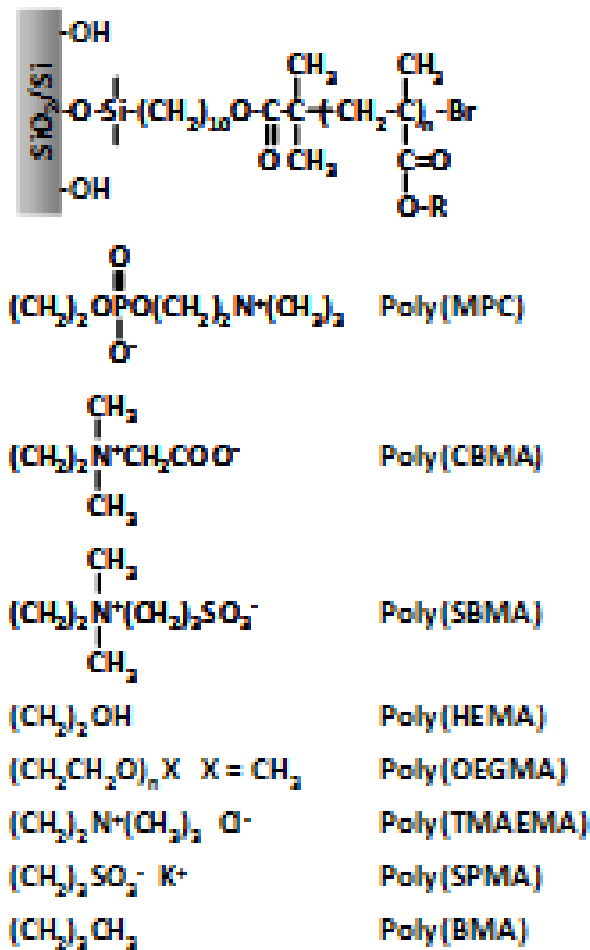


図1. ポリマーブラシ層の化学構造.

表1. ポリマーブラシ層の構造と特性.

Polymer	Graft density (chains/nm ²)	Surface coverage	DCA (°)			ζ-potential (mV)
			θ _{adv}	θ _{rec}	θ _{hys}	
Poly(MPC)	0.26	39%	21	17	4	-3.6
Poly(CBMA)	0.67	74%	22	16	6	-1.8
Poly(SBMA)	0.48	69%	23	17	6	-7.8
Poly(HEMA)	0.79	59%	65	24	41	-4.4
Poly(mOEGMA)	0.36	65%	50	37	13	-3.5
Poly(TMAEMA)	0.31	37%	62	19	43	45
Poly(SPMA)	0.47	70%	30	28	2	-74
Poly(BMA)	0.75	62%	90	70	20	-37

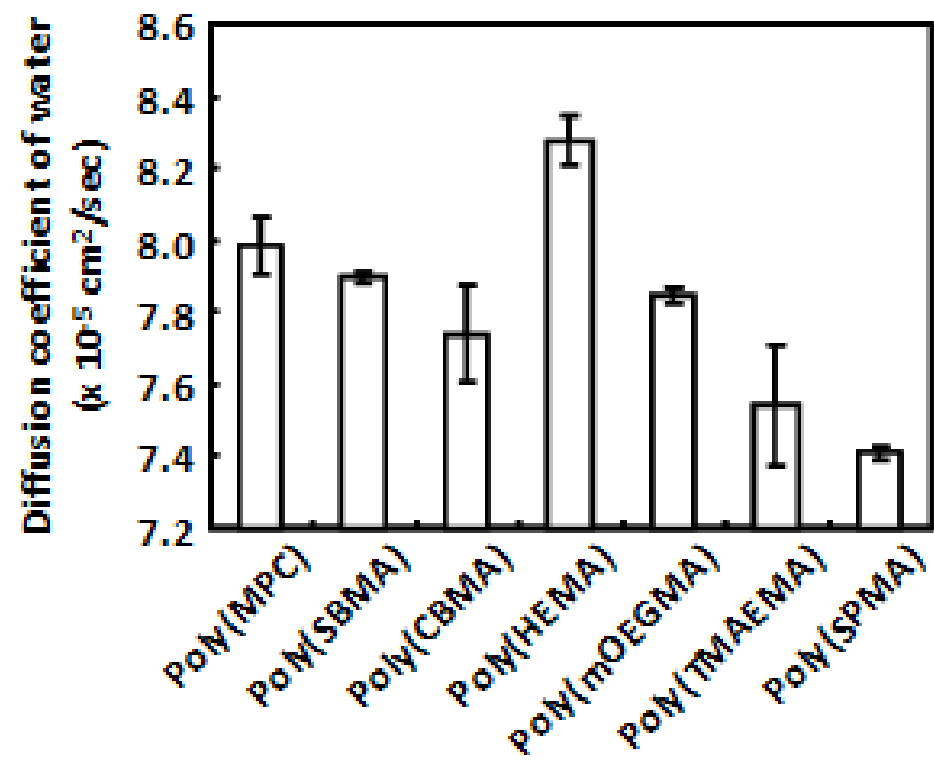


図2. ポリマーブラシ表面における水分子の自己拡散係数.

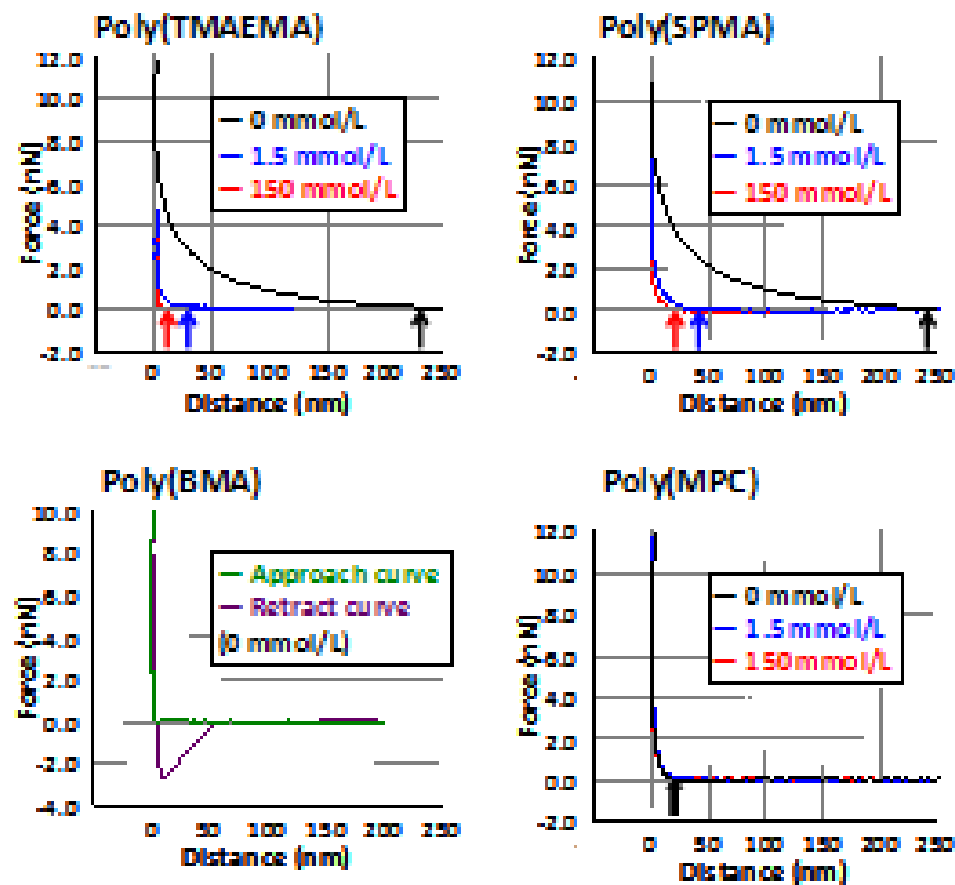


図3. 同種ポリマーブラシ表面同士の接近時のフォースカーブ。ただし、poly(BMA)においては、接近および離脱の際のフォースカーブを示す。

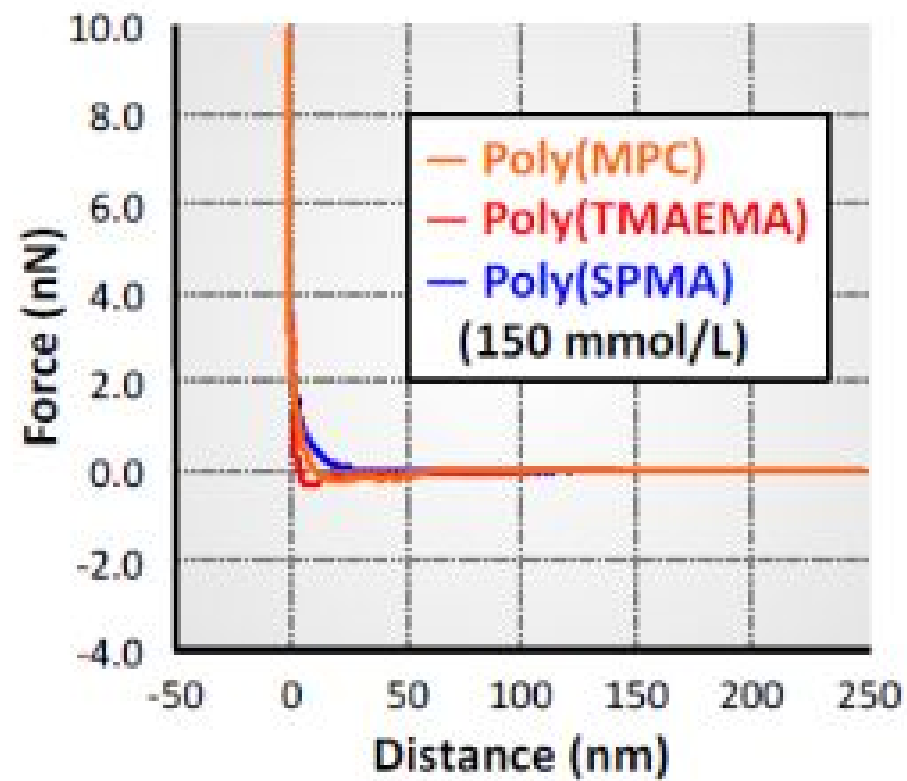


図4. 同種ポリマーブラシ表面同士の離脱時のフォースカーブ.

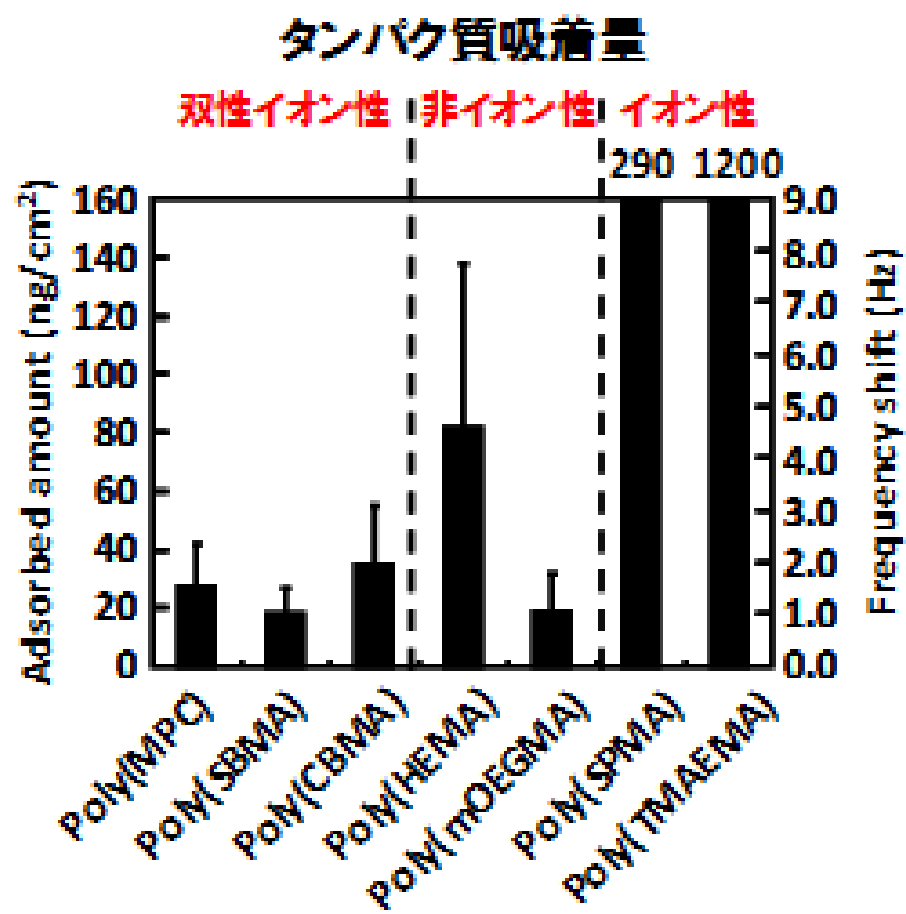


図5. 種々のポリマーブラシ表面へタンパク質吸着量.

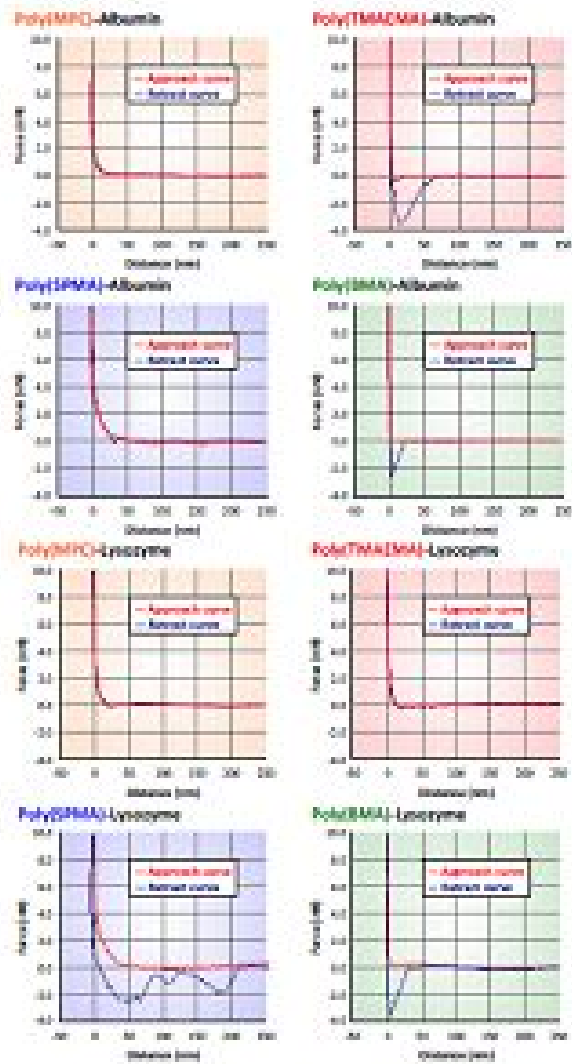


図6. 各ポリマーブラシ層とタンパク質との間のフォースカーブ。

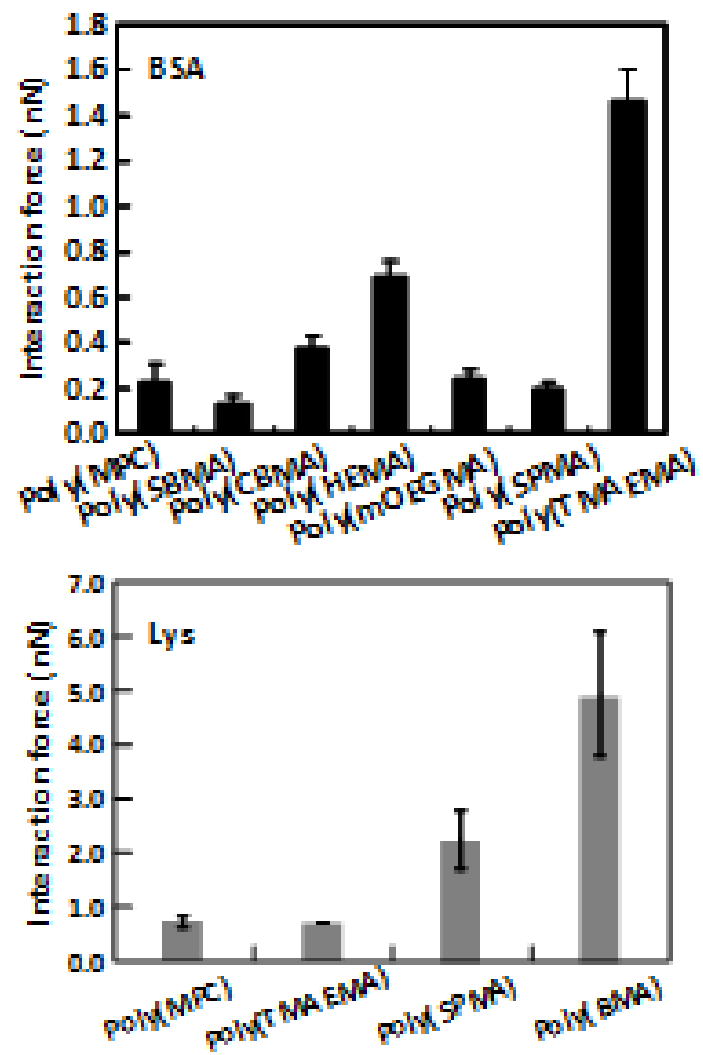


図7. 各ポリマーブラシ層とタンパク質との間のフォースカーブ.

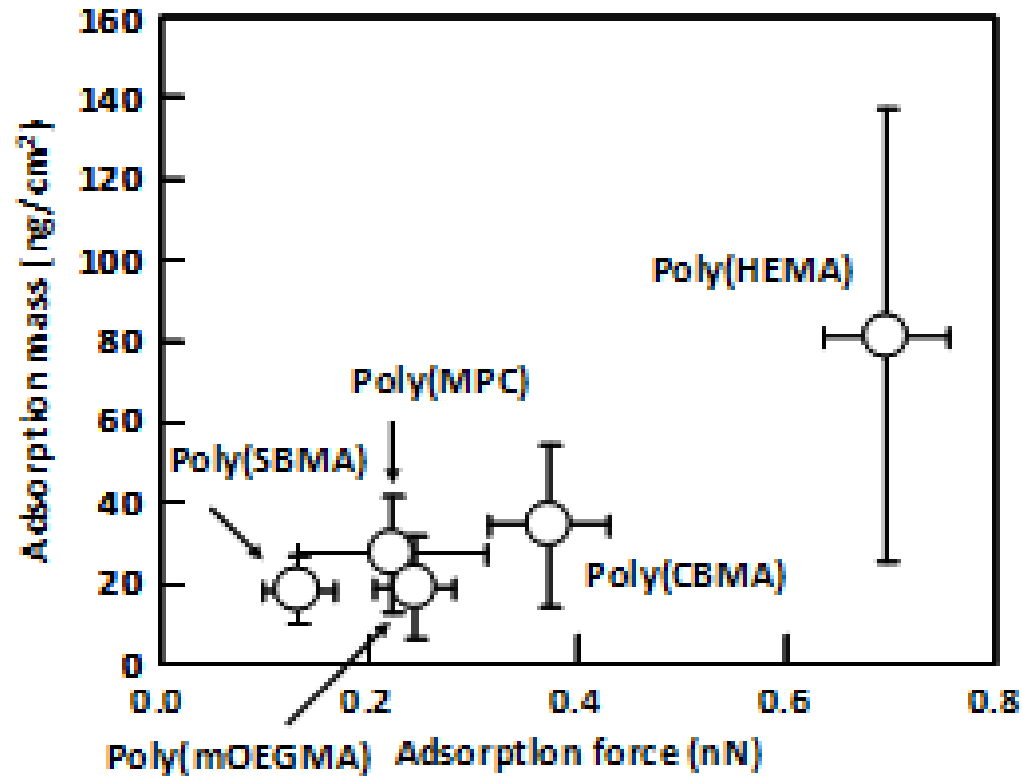


図8. 双性イオン性および非イオン性ポリマーブラシ表面におけるタンパク質吸着量とタンパク質吸着力との関係.

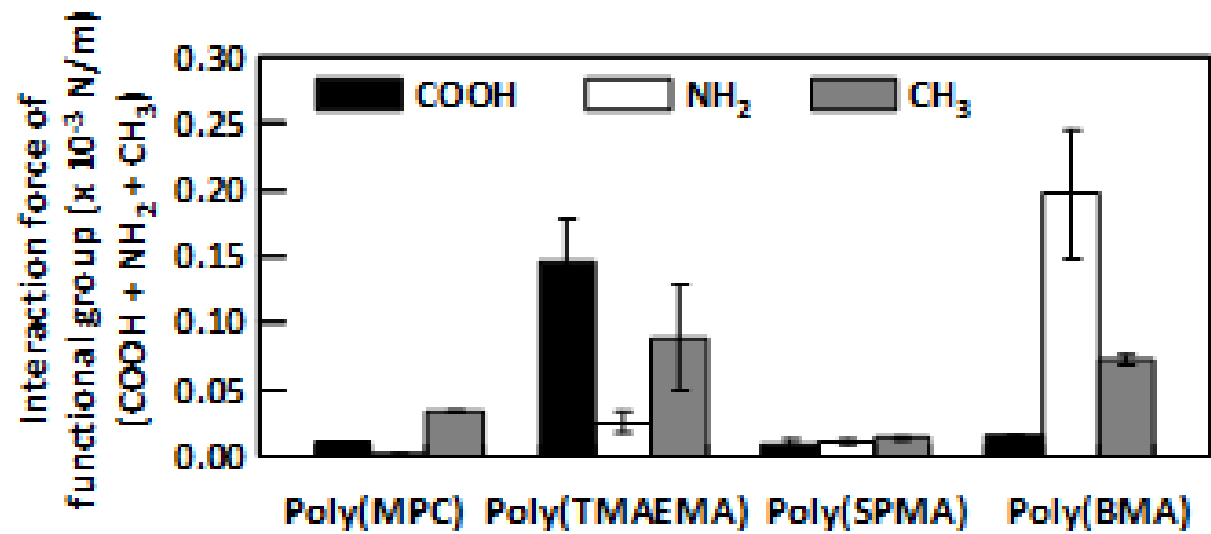


図9. ポリマーブラシ表面に対する官能基の相互作用.

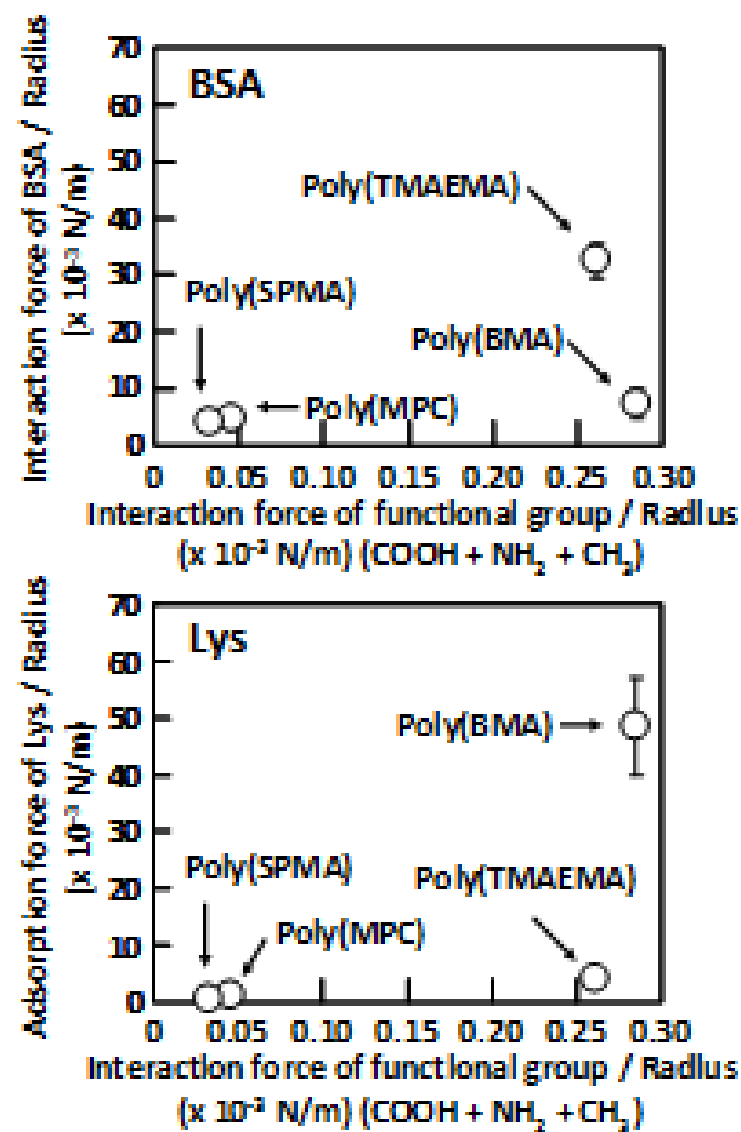


図10. 各ポリマーブラシ表面におけるタンパク質との相互作用と官能基との相互作用の関係。

分担研究報告書
厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名
中間水コンセプトによる新規生体適合性高分子の合成

研究分担者 田中 賢 山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻

研究要旨：本研究では、ポリマー 水界面に形成される特殊な水和構造（中間水）の発現に関係していると推察されるエーテル結合に注目し、エチレングリコール構造を主鎖または側鎖に導入した新規ポリマーを regio 選択的な開環メタセシス重合法（ROMP）を用いて合成し、得られたポリマーが発現する水和構造と抗血栓性の相関性について検討した。エチレングリコール側鎖長を変更したポリマーでは、エチレングリコールユニット数の増加に伴う中間水量の増加が確認され、ポリマーの一次構造の制御によって中間水量の制御に成功した。

A．研究目的

ポリマー材料を用いた血液接触型医療デバイスには、デバイス表面での血栓形成を防止する抗血栓性が求められている。しかし、ポリマー材料が抗血栓性を発現するメカニズムは解明されていない。我々は、ポリマー 水界面に形成される特殊な水和構造（中間水）が抗血栓性の発現に寄与しているとの仮説に基づき、ポリマーの一次構造の制御による、水和構造と抗血栓性の制御、およびこれを通じた抗血栓性の発現メカニズムの解明を試みてきた。

本研究では、中間水の発現に関係していると推察されるエーテル結合に注目し、エチレングリコール（EG）構造を主鎖または側鎖に導入した新規ポリマーを regio 選択的な開環メタセシス重合法（ROMP）を用いて合成し（Scheme. 1）、得られたポリマーが発現する水和構造と抗血栓性の相関性について検討を行った。

B．研究方法

モノマーとしてアリル位に3つのEGユニットを有する cyclooctene (COE) 誘導体と2つのメトキシ基をトランス型もしくはシス形で導入したCOE誘導体を合成した。ROMPにより得られたポリマーの主鎖中の二重結合に対して水素添加反応を行い、定序的に側鎖が並んだethyleneとのモデル共重合体を合成した。ポリマーと相互作用する中間水を定量化するために、得られたポリマーを含水させてDSC測定を行なった。また、血小板粘着試験により抗血栓性を確認した。

C．研究結果

モノマーのROMPによりポリマーを合成した後に、¹H-NMR、¹³C-NMR、2次元NMRを用いた構造解析を行なった。側鎖が一定の間隔で導入されたポリマーの生成を確認した（Fig.1）。

EG側鎖長を変更したポリマーでは、EGユニット数の増加に伴う中間水量の増加が見られ、ポリマーの一次構造の制御によっ

で中間水量を制御することができた(Fig.2)。また、多置換体のDSC測定結果から、相互作用する中間水量は立体異性体でおおよそ変わらないことが明らかになった。t-PMMは1つのEGユニットを側鎖に有するm=1よりもポリマー鎖の分子運動性が低下する可能性があるため、t-PMMの中間水量はm=1よりも減少すると推測していた。t-PMMの中間水量を調べたところ、実際にm=1よりも少ない値を示しており、推測通りの結果が得られた。ポリマーの抗血栓性を評価するために、ヒト血小板粘着試験を行なった。EG側鎖長を変更したポリマーでは、EGユニット数の増加に伴った血小板粘着数の減少が見られた。さらに、2つ以上のEGユニットを有するポリマーはPMEAと同程度の血小板粘着数を示していた。また多置換体はm=0とm=1の間の血小板粘着数を示した(Fig.3)。

D . 考察

抗血栓性の発現に最も寄与しているポリマー特性を調べるために、血小板粘着数とポリマー特性の相関性について検討した。

ガラス転移温度や液滴法によって得られた接触角の値と血小板粘着数の関係を調べたが、高い相関は得られなかった。ポリマーの主鎖の分子運動性や材料表面の親水性だけでは抗血栓性の発現について説明できないことがわかった。次に、血小板粘着数と自由水、不凍水、中間水の関係について検討を行った。不凍水量や自由水量に対する血小板粘着数の関係を調べたところ、同じ不凍水量、自由水量を有するポリマーでも血小板粘着数に差が見られた。次に、中間水量と血小板粘着数の相関性について検討した(Fig. 4)。血小板粘着数と中間水量の相関性は他のポリマー特性よりも高く、中間水量の増加に伴った血小板粘着数の減少が見られた。またトランス体は、発現した中間水量から予測されたとおり、目的としていた m=0 と m=1 の間の血小板粘着数

を示した。さらに、m=2 の場合でも血小板粘着を PMEA と同程度に抑制していたことから、ポリマー中に中間水量が 0.01 g/g 存在すれば抗血栓性を発現する可能性があることが明らかになった。以上の結果から、中間水量が抗血栓性に与える影響について考察した。中間水が存在しない材料表面では、最表面の不凍水によって吸着タンパク質の構造変化が多く生じ、血小板が多く粘着したと考えられる。しかし、ポリマー中に中間水量が少なくとも 0.01 g/g 存在すれば、タンパク質と不凍水の接触を中間水が防ぐため、吸着タンパク質の構造変化と血小板粘着を抑制したと考えられる(Fig. 5)。

E . 結論

本研究ではポリマーの一次構造の制御による、水和構造と抗血栓性の制御に成功し、抗血栓性の発現メカニズムを解明するための新たな知見を得ることができた。

F . 研究発表

1. 論文発表

- (1) T. Hoshihara, M. Nikaido, M. Tanaka, Characterization of the mechanisms of attachment of tissue-derived cell lines to blood-compatible polymers, *Adv. Healthcare Mater.*, 3, 775-784 (2014).
- (2) M. Tanaka, K. Sato, E. Kitakami, S. Kobayashi, T. Hoshihara, K. Fukushima, Design of biocompatible and biodegradable polymers based on intermediate water concept, *Polym. J.*, doi:10.1038/pj.2014.129

2. 学会発表

大澤康平, 小林慎吾, 田中賢, 側鎖間隔を制御した新規アミド基導入ポリマーの合成, 第63回高分子学会年次大会(2014/5/28-30, 名古屋)

戸来奎介, 福田考作, 小林慎吾, 田中賢, 側鎖-側鎖間の炭素数を制御した新規 PMEA 類似体の合成とその抗血栓性評価, 第63回高分子学会年次大会(2014/5/28-30, 名古屋)

福田考作,戸来奎介,小林慎吾,田中賢,regio 選択的な開環メタセシス重合による定序性ポリ(3,4-ジメトキシシクロオクテン)の合成とその抗血栓性評価,第 63 回高分子学会年次大会(2014/5/28-30,名古屋)

片岡真依子,岩田幸久,小林慎吾,田中賢,Regio 選択的な開環メタセシス重合を用いた新規 PTHFA 類似体の合成とその血液適合性評価,第 63 回高分子学会年次大会(2014/5/28-30,名古屋)

Meng-Yu TSAI, Yuto INOUE, Takayuki OTA, Kazuki FUKUSHIMA, Masaru TANAKA, DSC Study of Hydrated Aliphatic Carbonyl Polymers, 第 63 回高分子学会年次大会(2014/5/28-30,名古屋)

井上裕人,佐藤千香子,佐々木彩乃,福島和樹,田中賢,抗血栓性脂肪族ポリカーボネートの細胞接着性と生分解性,第 63 回高分子学会年次大会(2014/5/28-30,名古屋)

太田貴之,蔡孟諭,福島和樹,田中賢,エーテル置換基を有する環状カルボニル化合物の合成と開環重合,化学系学協会東北大会(2014/9/20-21,米沢)

片岡真依子,岩田幸久,小林慎吾,田中賢,テトラヒドロフラン環を側鎖に有する定序性ポリマーの合成,化学系学協会東北大会(2014/9/20-21,米沢)

大澤康平,小林慎吾,田中賢,側鎖間隔を制御した新規アミド基導入ポリマーの合成とその水和構造解析,化学系学協会東北大会(2014/9/20-21,米沢)

泉井美幸,岩田幸久,小林慎吾,田中賢,Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価,化学系学協会東北大会(2014/9/20-21,米沢)

甘三奇,小林慎吾,田中賢,水酸基を有するポリ(メタ)アクリレート誘導体の合成とその血液適合性評価,化学系学協会東北大会(2014/9/20-21,米沢)

福島和樹,太田貴之,高岡駿矢,佐藤駿介,松崎

広大,岸昂平,有機分子触媒を用いた機能性バイオマテリアルの精密合成,第 63 回高分子討論会(2014/9/24-26,長崎)

福島和樹,蔡孟諭,太田貴之,井上裕人,岸昂平,田中賢,脂肪族エステル系ポリマーの抗血栓性と水和に及ぼす構造因子の解析,第 63 回高分子討論会(2014/9/24-26,長崎)

干場隆志,佐藤一博,大類寿彦,丸山寛花,遠藤千穂,田中賢,中間水が異なる高分子による細胞接着の制御とその応用,第 63 回高分子討論会(2014/9/24-26,長崎)

小林慎吾,福田考作,戸来奎介,北上恵理香,片岡真依子,大澤康平,regioselective ROMP 法を用いた定序性高分子の合成とバイオマテリアルへの応用,第 63 回高分子討論会(2014/9/24-26,長崎)

大澤康平,小林慎吾,田中賢,Regio 選択的な開環メタセシス重合による側鎖間隔を制御した新規アミド基導入ポリマーの合成とその水和構造解析,第 63 回高分子討論会(2014/9/24-26,長崎)

Shenyao Xue, Shingo Kobayashi, Masaru TANAKA, Hiroyuki Furusawa, Measurements of Hydration Amount and Viscoelasticity of Biocompatible Polymers using Quartz-Crystal Microbalance with Dissipation Technique, SmsSys2014(2014/10/15-17,米沢)

大澤康平,小林慎吾,田中賢,Synthesis of Polymers Having Amide Side-chains and Analysis of Hydration Structure, SmsSys2014(2014/10/15-17,米沢)

岸 昂平,井上裕人,佐々木彩乃,佐藤千香子,田中賢,福島和樹, Polymeric Degradable Antimicrobials with Enhanced Blood Compatibility, SmsSys2014(2014/10/15-17,米沢)

田中賢,佐藤一博,北上恵理香,小林慎吾,干場隆志,福島和樹,中間水コンセプトによる生体親和性高分子の設計と診断・治療デバイスへの応用,第23回ポリマー材料フォーラム(2014/11/6-7,奈良)

泉井美幸,岩田幸久,小林慎吾,田中賢,Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価,第25回バイオマテリアル若手研究会(2014/11/6-7,八王子)

片岡真依子,小林慎吾,田中賢,テトラヒドロフラン環を側鎖に有する定序性高分子の合成と抗血栓性評価,2014 高分子学会東北支部会(2014/11/13-14,郡山)

福島和樹,機能性脂肪族ポリカーボネートを用いたバイオメディカル材料の新展開,2014 高分子学会東北支部会(2014/11/13-14,郡山)

佐藤一博,小林慎吾,綿引省吾,及川昌彦,干場隆志,田中賢,エチレングリコール鎖に注目した Poly(2-methoxyethyl acrylate)類似体の高分子-水相互作用の解析と抗血栓性評価,第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014/11/17-18,東京)

片岡真依子,小林慎吾,田中賢,テトラヒドロフラン環を側鎖に有する定序性高分子の合成と抗血栓性評価,第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014/11/17-18,東京)

福田考作,戸来奎介,小林慎吾,田中賢,ポリ(3,4-ジメトキシシクロオクテン)の合成とその抗血栓性評価,第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014/11/17-18,東京)

泉井美幸,岩田幸久,小林慎吾,田中賢,Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価,第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014/11/17-18,東京)

井上裕人,佐藤千香子,佐々木彩乃,福島和樹,田中賢,,抗血栓性を示す生分解性ポリカーボネートを含むポリウレタンの合成と特性評価,第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014/11/17-18,東京)

太田貴之,蔡孟諭,井上裕人,福島和樹,田中賢,生分解性ポリマーの水和に関する構造因子の解析と抗血栓性への効果,第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014/11/17-18,東京)

甘三奇,小林慎吾,田中賢,Water structure of blood compatible poly[hydroxyalkyl(meth)acrylate]s,第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014/11/17-18,東京)

戸来奎介,福田考作,小林慎吾,田中賢,Synthesis and blood-compatibility evaluation of novel PMEA analogs having precisely placed side-chain branches.,第10回 IPC2014(2014/12/2-5,つくば)

片岡真依子,小林慎吾,田中賢,Synthesis of novel polymers having precisely placed tetrahydrofurfuryl side-chain branches via regioselective ring-opening metathesis polymerization and their blood compatibility evaluation,第10回 IPC2014(2014/12/2-5,つくば)

福田考作,小林慎吾,田中賢,Synthesis of sequence- and geometry-specific poly(3,4-dimethoxycyclooctene)s and their antithrombotic evaluation,第10回 IPC2014(2014/12/2-5,つくば)

佐藤一博,小林慎吾,綿引省吾,及川昌彦,干場隆志,田中賢,The relationship between water structure and blood compatibility in poly(2poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) analogues,第10回 IPC2014(2014/12/2-5,つくば)

福島和樹,井上裕人,岸昂平,太田貴之,Meng-Yu TSAI,佐藤駿祐,松崎広大,Functional Degradable Biomaterials Based on Organocatalysis and Substituted Cyclic Carbonates,第10回 IPC2014(2014/12/2-5,つくば)

小林慎吾,福田考作,戸来奎介,片岡真依子,大澤康平,田中賢,Synthesis of Sequence-specific Polymers via Regioselective ROMP and Biomaterial Applications,第10回 IPC2014(2014/12/2-5,つくば)

甘三奇,小林慎吾,田中賢,Synthesis and anti-thrombotic evaluation of novel PHEMA analogs having different side-chain structures,第10回 IPC2014(2014/12/2-5,つくば)

大澤康平,小林慎吾,田中賢,Synthesis of novel regioregular polymers having amide side-chains via regioselective ring-opening metathesis polymerization and their biocompatibility evaluation,第10回 IPC2014 (2014/12/2-5,つくば)

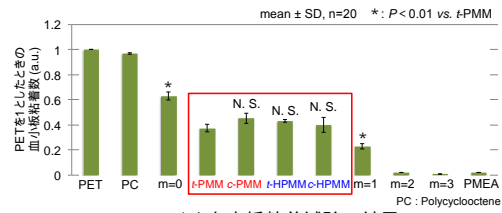


Fig. 3 ヒト血小板粘着試験の結果

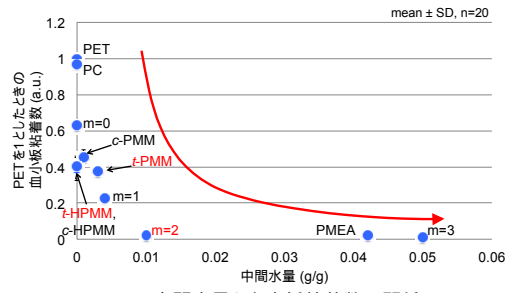


Fig. 4 中間水量と血小板粘着数の関係

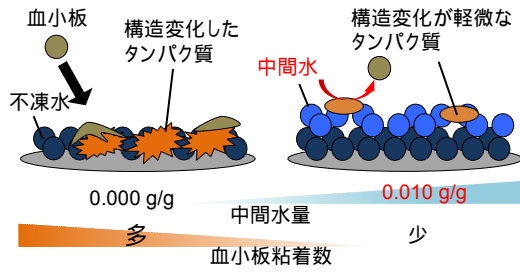


Fig. 5 中間水量が抗血栓性に及ぼす影響

「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

国際標準歯科インプラント材料の有効性及び安全性評価に関する研究

研究分担者 佐々木 啓一 東北大学大学院歯学研究科長

研究要旨

本研究では、アカデミア、独立行政法人医薬品医療機器総合機構、日本歯科材料工業協同組合の3者が連携し、歯科用インプラントの承認審査で行うべき疲労試験のワーストケース設定やインプラント表面処理方法などに関する考え方を、科学的エビデンスに基づき学術的に検討、整理し、歯科インプラントが真に具備すべき要件を再考し、「課題解決に向けた提言」の取り纏めワーストケース”選定のためのフローチャート案（ISO 14801 準拠）の提案を行った。

本研究をベースとして、我が国での審査基準など審査の考え方を再構築することで、申請資料作成の効率化及び審査の迅速化を図り、さらには、新たな国際標準設定に資するものとして、世界に情報発信することにより、国内歯科医療機器産業への波及効果も期待できる。

A．研究目的

歯科分野の各種医療機器の承認審査において、審査期間の長期化をはじめとするいくつかの課題が指摘されている。殊に、近年、国内外で数多くの新製品が創出されている歯科インプラント分野では、これら課題が顕在化しつつあり、新規製品の上市の遅延が本邦における国際標準の歯科インプラント治療の拡大を妨げる一因となっているとの指摘がある。さらに国産プロダクトの上市遅延が国内企業の競争力を低下させているとの指摘もある。

その解決へ向けて、厚生労働省から平成21年5月に「歯科用インプラント承認基準の制定について」、平成24年7年に「歯科用インプラントの承認申請に関する取扱いについて（Q&A集）」が通知され、具体的な審査の取扱いが示されたところである。しかし、現時点においてもなお、関連団体から申請時に必要な疲労試験における機械的強度の評価項目の明確化や簡素化が求められるなど、未だ課題を残している。

また厚生労働省は、平成21年12月にとりまとめた「医療機器の審査迅速化アクションプログラム」に基づき、審査迅速化に取り組んでいるところであり、全体としては審査期間の改善がみられている。しかし歯科分野の審査については依然、長期化している品目も多く、業界団体からも更なる改善が求められている。これら背景から、承認申請が多い歯科インプラントの審査の改善は急務となっている。

そこで本研究では、アカデミア、独立行政法人医薬品医療機器総合機構、日本歯科材料工業協同組合の3者が連携し、承認審査で特に課題となっている歯科用インプラントの疲労試験におけるワーストケース設定の根拠や、インプラント表面処理方法などに関する考え方を、科学的エビデンスに基づき検討、整理し、歯科インプラントが具備すべき要件を再考することを目的とした。

本研究の成果を基盤とし、本邦での審査基準等、審査の考え方を再構築することで、申請資料作成の効率化および審査の迅速化を図るとともに、新たな国際標準の設定に資するものとして世界に情報発信することにより、国内歯科医療機器産業への波及効果も期待できる。

B．研究方法

本研究では、現在の歯科インプラント承認審査の課題を抽出、科学的な根拠に基づき、その解決策を検討することを目的とするため、歯科インプラントに関連する学会や大学等からの研究者（アカデミア）、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）、日本歯科材料工業協同組合の3者が密に連携し、研究を遂行した。具体的には、下記の班会議の構成メンバーにより、特に歯科インプラントの疲労試験のワーストケース設定などの考え方について審査側と申請者側で問題と考えている事項を把握し、明確な科学的エビデンスに基づき検討することで、我が国での審査基準など審査の考え方を再構築することを目的とし、平成25年度および26年度で計6回の班会議を行った。

なお、追加エビデンスの必要性が生じたため、疲労試験におけるワーストケース設定に関し、FEMにおける簡略モデルの可能性を検討する目的で、JFEテクノロジー（株）に委託し、有限要素解析法（FEM）を用いた実験を行った。

【班会議構成メンバー】

研究分担者

佐々木啓一（東北大学大学院歯学研究科 研究科長・教授、日本補綴歯科学会 理事・元理事長）

研究協力者

新家 光雄（東北大学金属材料研究所・前所長、日本金属学会理事長）

埴 隆夫（東京医科歯科大学生体材料工学研究所・前所長、前日本歯科理工学会会長）

渡邊 文彦（日本歯科大学新潟生命歯学部 教授、日本口腔インプラント学会 理事長）

古谷野 潔（九州大学歯学研究院 教授、日本口腔インプラント学会 理事・学術委員長、日本補綴歯科学会 理事・前理事長）

矢谷 博文（大阪大学大学院歯学研究科 教授、日本補綴歯科学会 理事長）

窪木 拓男 (岡山大学大学院医歯薬総合研究科
歯学部長・教授、日本補綴歯科学
会 理事・学術委員長)
長嶋 利夫 (上智大学理工学部 教授)
東藤 貢 (九州大学応用力学研究所 准教授)
金高 弘恭 (東北大学大学院歯学研究科 准教授、
PMDA医療機器審査第二部)

なお、班会議にはオブザーバーとして、厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器・再生医療等製品担当参事官室、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)の関係部署(医療機器審査第二部および第三部、規格基準部)、日本歯科材料工業協同組合が参加している。

【H25年度第1回研究班会議】

日時：平成26年2月7日(水) 17:30～19:00
場所：「東京八重洲ホール」412号室
内容：

本研究の目的および承認審査の現況について、厚生労働省やPMDAより説明があり、その後、班員間の議論により、承認審査に関する情報の共有および問題点の整理を行った。

【H25年度第2回研究班会議】

日時：平成26年3月17日(月) 17:30～19:30
場所：「フクラシア東京ステーション」6階
会議室A

内容：
歯科インプラントに関して承認申請を行った実績を持つ国内外の企業を数社招聘し、申請者側から見た現状での承認審査の問題点および要望、意見をヒアリング調査した。これにより企業側が考える承認審査における問題点の整理を行った。

【H25年度第3回研究班会議】

日時：平成26年3月24日(水) 15:30～17:00
場所：「東京八重洲ホール」511号室
内容：

第1回および第2回班会議において抽出した審査側(PMDA)および申請者側からの課題について整理、集約し、科学的な根拠に基づき学術的に検討し、「課題解決に向けた提言」として取り纏めを行った。

【第1回研究班会議】

日時：平成26年6月24日(水) 18:00～19:30
場所：「フクラシア東京ステーション」6階
会議室C

内容：
本研究の目的および承認審査の現況について厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器・再生医療等製品担当参事官室より説明があった。また、H25年度の研究班報告について佐々木研究班班長より説明があり、課題解決に向けた提言について、PMDAおよび日本歯科材料工業協同組合から意見を伺った。その後、今後の研究の進め方および承認審査に関する情報交換を行った。なお、日本歯科材料工業協同組合でH25年度研究班報告に対する業界意見を取り纏め、次回の委員会まで提出することになった。

【第2回研究班会議】

日時：平成26年12月22日(月) 17:00～19:00
場所：「フクラシア東京ステーション」6階
会議室C

内容：
日本歯科材料工業協同組合より、「H25年度の研究班報告及びH26年度ロードマップに対する業界側意見」と「インプラントシステムの疲労試験に用いる試験体選択(ワーストケース)の考え方」が提出された。これにより申請者側が考える承認審査における問題点が説明されるとともに、疲労試験のワーストケースの選定に静的荷重試験を含めることが要望された。また、ISOインプラントエキスパートより、ISO14801の改訂動向に関する説明があった。

【第3回研究班会議】

日時：平成27年3月5日(水) 18:00～19:30
場所：「トラストシティ カンファレンス・丸の内」
Room 1

内容：
申請者側(日本歯科材料工業協同組合)から、第2回研究班会議で要望された疲労試験のワーストケースの選定に静的荷重試験を含めることに対する根拠として、「歯科用インプラントにおける最大耐久荷重と静的試験結果との相関について」が示された。また、佐々木研究班班長より、「“ワーストケース”選定のためのフローチャート案(ISO14801準拠)」が示され、それに対するPMDAおよび日本歯科材料工業協同組合から意見の聞き取りを行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトを対照としていないため、該当なし。

C. 研究結果

【(1) 現在の歯科インプラント承認審査の問題点の整理(H25年度第1・2回研究班会議)】

歯科インプラントの疲労試験におけるワーストケースの設定などに関する考え方を検討するため、承認審査における問題点について審査側、申請者側から意見を聞いて検討すべき論点を明確にした。

「課題解決に向けた提言」提案のための論点整理

審査側と申請者側から意見を聞いた結果、疲労試験におけるワーストケースの設定について双方の考え方が一致していない点が多く見受けられた。したがって、本研究班においては歯科用インプラントの審査的的確化、適正化を図るべく、臨床的観点、工学的・材料学的視点を踏まえて、今後の審査におけるワーストケースの選定の考え方について、科学的な根拠に基づき検討、整理し、現時点における考え方を示すこととした。

また、検討に当たっては、国内製造品、外国製造輸入品とも、形状、嵌合部、材質等、様々な製品が製造されていること、例えば、フィクスチャの選定など、各国における臨床現場での使用実態に違いがあること、製品自体の強度を評価することは重要であるが、実際に使用される際のインプラント

の強度は臨床現場での使用状況によっても変わり得るものであること等の状況を十分考慮した上で、我が国におけるワーストケース選定の考え方を合理的に定め、承認審査では個別製品に応じて柔軟に判断することが必要と考えられた。

以上を踏まえ、「課題解決に向けた提言」提案のために検討が必要な論点を以下のとおり整理した。

【論点】

- 1) 疲労試験のワーストケース選定の基本的考え方（臨床現場の使用実態、工学的評価の観点）
- 2) FEM解析データの適切な活用方法
- 3) FDAでの評価データ受入のための方策
- 4) 既承認品との比較の必要性

（2）追加評価実験の実施

方法

疲労試験における機械的強度評価におけるワーストケース設定に関し、FEMにおける簡略モデルの可能性を検討する目的で、JFEテクノロジー（株）に委託し、有限要素解析法（FEM）を用いた実験を行った。

フィクスチャ/アバットメント/アバットメントスクリューからなる歯科用インプラント（3.3）を基本に、アバットメントに荷重を作用させるための半球治具を付加したものを基本モデルとした。さらに、アバットメント半球治具の構造を変化させた2つの簡略モデルを作成し、計3ケースにつき弾性FEM解析（ISO14801準拠）を行い、各部材に発生する応力状態を比較した。

今回はあくまでも下記の実験条件での結果であり、今後、実機試験とのバリデーションを要する。

【解析した3ケースのモデルの特徴】

- ・基本モデル
 - ・全部品とも形状省略しないオリジナルモデル
 - ・包埋平面からアバットメント先端の距離：13.5mm（包埋平面と荷重中心との距離：11mm）
- ・簡略モデル
 - ・アバットメントの荷重中心から上部の2.5mm削除
 - ・包埋平面からアバットメント先端の距離：11mm（包埋平面と荷重中心との距離11mm）
- ・簡略モデル
 - ・解析には、最も簡略化したモデル
 - ・アバットメントの荷重中心から上部の2.5mm削除
 - ・半球治具を削除
 - ・包埋平面からアバットメント先端の距離：11mm（包埋平面と荷重中心との距離：11mm）
 - ・アバットメント上部端面に（仮想）剛体面を取り付け、荷重中心に荷重を負荷

実験結果

アバットメント～半球治具の構造を変化させた3ケースのインプラントについて、ISO14801の圧縮疲労試験に準拠した強度解析（3次元弾性FEM解析：荷重100[N]）を行い、下記の結果を得た。

- 1) 包埋平面と半球荷重部の中心との距離が11mm以上

の部位については、削除しても最大主応力分布には影響しない。

- 2) 解析した範囲内では、半球治具を削除しても最大主応力分布に影響がなかったことから、解析モデルの簡略化についての可能性が示唆された。

（3）課題解決に向けた提言

（H25年度第3回研究会議）

班会議を通じ抽出された課題ならびに課題に対する科学的な検証結果に基づき、我が国での歯科インプラント審査基準等、審査の考え方を検討した結果「課題解決に向けた提言」を提案した。

1）基本方針

- ・疲労試験は、ISO14801規格に準じるものとする。
- ・ISO14801規格に基づく疲労試験は、歯科インプラント複合体に関する評価であり、歯科インプラントの構成体の疲労強度を評価する。そのため、骨等の生体に対する評価とは切り離して考えなければならない。
- ・ワーストケースの選定については、臨床での使用も考慮することが重要であり、このような考え方が併せて議論されているISOの検討状況も十分勘案する。

2）ワーストケースの選定

フィクスチャ（インプラント体）の形状

- ・フィクスチャの直径
 - ・包埋平面での断面の径が最小のものを選択
 - ・フィクスチャの頸部が細いタイプにおいても、径の変化を考慮し、包埋平面断面で最小径となるものを選択
- ・フィクスチャの長さ
 - ・ISO14801では、フィクスチャを包埋固定し、荷重を付加するため、基本的にはフィクスチャの長さに関する評価は困難である。長さ8mm未満のフィクスチャはそもそも包埋が困難であるため試験系で用いることは現実的ではなく、8mm未満のフィクスチャの包埋平面での断面の径が最小であっても8mm以上で最も短い検体にて疲労試験すること。よって、8mm以上のインプラント体の長さは評価されていると判断することは可能と考えられる。

アバットメントの形状

- ・各バリエーションにおいて、最も径が細いものを選択する。
- ・長さについては、包埋平面と半球荷重部の中心との距離がISO規格の11mmとすることを基本とする。
- ・長さが大きく変わらない場合には、径が優先される。

なお、以下に関しては現状での考え方であり、今後、さらなる検討を行う。

- ・ストレートとアングルは、別途の評価が必要である。
- ・アバットメントで現在考えられるバリエーションのうち、以下のものについては、流通する形態そのものではなく、臨床現場で用いるための加工後に想定される径・角度を用いる。

- 切削加工するアバットメント
- キャストアバットメント
- マルチピースアバットメント

接合部の形状

以下に関しては現状での考え方であり、今後、さらなる検討を行う。

- ・各形状ごとに検討が必要である。
- ・インプラント体とアバットメント、それぞれの材料が同じで、嵌合部が同一形状であれば、破折機序等に鑑みインプラント体またはアバットメントの外形の肉厚が薄いものを選択する。

3) FEM解析データを活用したワーストケースの選定について

ワーストケースの選定に当たっては、2)に基づき判断することが基本であるが、FEMを用いて説明することも可能と考えられるため、FEMをどのように活用できるか考え方を整理した。

現時点でのFEM利用に関する基本的な考え方

- ・FEMの一般的な解析では、静的な荷重条件下での構造体内部の応力分布をみているものであり、繰返し荷重下での疲労試験による破壊強度とは異なるものである。
- ・従って、その数値が比較できるものではない。
- ・同一の材料であれば応力集中が高いものほど疲労破壊を起こしやすい、という前提に立つ。

今後の具体的な活用方法

これまでの検討結果から考えうるFEMの活用方法(案)は以下のとおりであるが、今後さらに検討を進める。

今後は、FEMの結果を受け入れ可能とする条件、すなわちFEMのモデル条件、荷重条件等を明示し、それらをフロー図等で作成、提示することが求められる。そのうえでISOへ提案していく。

FEMはワーストケース選定のための解析手法となり得るが、その場合は、申請品目においてFEMにてワーストケース選定が可能である妥当性を説明できる必要があり、申請者がその点を十分理解した上でFEM解析を実施する必要がある。

【FEMの活用方法(案)】

- 嵌合機構が同じ場合には、同一原材料のサイズの違いを比較検討することが可能であること。
- 比較する部位以外の試験条件は揃えること。
- 通常はストレートとアングル、その他類似形状、サイズ違いの比較も含めてワーストケースの選定に使用することができること。

- 応力集中度合いの高いものをワーストケースと判断すること。
- 応力集中部位と実機試験の破折部位が一致する必要があること。

FEMにおけるバリデーションの考え方の整理

FEMでの検討結果と実機での疲労試験との相関性について、実験を行いながら、どこまで示すことが可能か今後検討する。

4) その他

審査における課題を解決するためには、1)から3)のほか、以下の点についても今後整理すべきと考えられた。

- ・既承認品を利用した疲労試験の必要性
 - ・比較検討のための既承認品との試験条件の同一性の必要条件を明らかにする。
 - ・規格値の設定
- ・医療現場の状況(使用方法の制限、市販後調査等)からリスクを管理することで評価を簡素化できるかどうか：市販後の管理

(4) 平成25年度課題解決に向けた提言について (H26年度第1・2回研究会議)

本提言に対しては、日本歯科材料工業協同組合から、各項目ごとの問題点、疑問点等が提示され、第2回研究会議において対応が協議された。また「インプラントシステムの疲労試験に用いる試験体選択(ワーストケース)の考え方」として、従来のFEMによる選択に加えて、静的荷重試験による試験体選択方法を追加することが提案された。

【インプラントシステムの疲労試験に用いる試験体選択(ワーストケース)の考え方】(申請者側提案)

これまで、フィクスチャ(インプラント体)のワーストケースにアバットメントのワーストケースを組み合わせたものが、インプラントシステムのワーストケースであると解釈されてきたが、その試験体の組合せが、必ずしもそのインプラントシステムの臨牀的なワーストケースであったとは言えない。

生体組織に埋植されるが故に、その除去にあたっては生体への大きな侵襲行為となる撤去処置に至るフィクスチャの破折が、インプラントシステムの臨牀使用におけるワーストケースである。そのため、これまで大部分のインプラントシステムでは、フェイルセーフの考え方を基に、万一の場合には交換可能な部品において不具合を発生させることを基本思想として設計・開発がなされている。即ち、インプラントシステム開発段階では、システム設計上における交換可能な部品として、補綴物をシステムに締結するためのスクリュー、アバットメントをフィクスチャに締結するスクリュー、に不具合を発生させ、フィクスチャを保護するという思想のもとで設計・開発されている。

これらの設計思想に鑑みて実際に、臨牀経過の各種レビュー論文を調査したところ、その内容によれば、予後観察中に発生したインプラントシステムに

関わる不具合のうち、スクリュー類の緩み、破折が大部分であり、フィクスチャの破折事例は、スクリューの事例と比較してはるかに発生頻度が低く（アバットメント破折の発生頻度はさらに低い）、各インプラントシステムの設計思想が正しく反映され機能していることが示されている。

一方、ISO14801の疲労試験は、その結果から臨床でのインプラントの性能を予測するものではないことが明記され、現在の承認審査におけるISO14801の疲労試験は、申請品目の中で最も疲労強度の低い値を示すものと既承認品目の疲労強度の比較となっている。従って、承認申請におけるワーストケースでの疲労試験の試験体には、申請品目の中で最も低い疲労強度を示すものを選択することと解釈される。

この考え方の上に立って、インプラントシステムにおける承認申請のためのワーストケースについて、現在のFEMを利用する方法に加えて、次の方法を提案する。

フィクスチャの選択は、研究班の報告にあるように包埋平面での断面の径が最小のものを基準として選択する。問題はアバットメントを選択する方式にある。種々のアバットメントの中から、フィクスチャと組み合わせた場合のワーストケースとして、組み合わせでの静的強度が最も低くなるアバットメントを選択するには、インプラントシステムを組み立てた状態でISO 14801の試験配置で静的試験を行い、その中から最も低い値を示すアバットメントを選択する。この際、インターナルとエクスターナルの嵌合部の違い、ストレートとアングルの試験配置の違いは、それぞれの組合せで静的強度が最も低いものを選択する。このようにして選ばれた静的強度が最も低い組合せをインプラントシステムのワーストケースとして選択し、ISO14801の疲労試験を行う。

ここで静的試験を選んだ理由としては、実際に製品開発の途上で多くの会社が用いている試験が静的試験であること、FEMは静的荷重条件下での応力・ひずみ解析（集中部位の検出）であること、また、ISO 14801の疲労試験においても、その開始荷重の決定には静的試験を利用していることから、最も低い値を示す組合せの選択に、ISO 14801の試験配置での静的試験を利用することは妥当であると判断している。

現在、ワーストケースの選択については、国際的に標準化されておらず、各国独自の判断で運用されている状況である。また標準化には多大な時間が掛かるものと予想されることから、国際標準化されるまでの間は、現在の承認審査における申請者側のワーストケースの選択における負担を軽減する意味からも、従来のFEMによる選択に加えて、上記の静的試験による選択も可とする取扱いを提案する。

（５）疲労試験に用いる試験体選択（ワーストケース）の考え方（第3回班会議）

インプラントシステムの疲労試験に用いる試験体選択（ワーストケース）において、日本歯科材料工業協同組合より、従来のFEMによる選択に加えて、静的荷重試験による試験体選択方法が要望され、提案を裏付けるデータが示された。

ただし、サンプル数の不足や科学根拠の不足などの問題が散見されたため、材料組合からの提案については継続して検討することとなった。

（６）“ワーストケース”選定のためのフローチャート案（第3回班会議）

現在、改正案が提案されているISO/DIS 14801 Annex Aを参考にした「“ワーストケース”選定のためのフローチャート案（ISO 14801 準拠）」（別添資料）が示された。これに対し、日本歯科材料工業協同組合から、日本はISO/DIS 14801に反対投票していることが説明されるとともに、業界側が考えるフローチャート案が別途提案されることとなった。

D．考察

本邦においては、世界最高水準の学術レベルのみならず、加工技術にも優れているものの、医療機器に関しては、その多くを輸入に頼っているのが現状である。歯科インプラントについては8割以上を輸入に頼っている。現在政府では、医療分野を成長戦略として位置づけており、国内の医療機器産業を活性化し、革新的な製品を世界に先駆けて実用化できるような環境整備の取組を進めている。このためには薬事規制に関する取組も必要であり、承認審査に関しても迅速化に向け産業界のみならず、学・官も含めたオールジャパン体制での対策が急務である。

しかしながら、歯科分野、特に歯科用インプラントでは承認審査に時間がかかる品目も多く、上市が遅れることにより、結果的に本邦での国際標準の歯科インプラント治療の展開の遅れ、また国産インプラントの国内・国際競争力の低下等を招く結果となっている。

現在の状況を作り出している一因は、審査基準や関連のQ&Aがまとめられているものの、当該基準の解釈について、審査側と申請者側の考え方が一致していないことにあると考えられ、その結果として承認審査のやりとりに時間が生じることであった。承認審査では、有効性・安全性が確認できるデータをもとに評価していくのは当然であり、申請者側でもそのためのデータ収集は必須である。他方、歯科インプラントで今回論点となった機械的強度（疲労試験）は、実際に臨床現場で使用される実態を考えると、製品自体の強度のほか、使用実態等による影響もあることから、一定の合理性をもって製品の強度が確認できれば現時点では大きな問題は生じないと考えられる。

本研究には、特に審査において問題となっている歯科インプラントに関して、アカデミア、独立行政法人医薬品医療機器総合機構、日本歯科材料工業協同組合の3者が密に連携し、課題を整理し、今後の承認審査が合理的に対応できるような提言を取りまとめることを目的とし、我が国での審査基準など審査の考え方を検討することができた。

具体的には、平成25年度には、疲労試験のワーストケース選定の基本的考え方について、インプラント形状における長さ、径、アングルの有無、嵌合機構の形状に関して審査基準に関する提言を取り纏めることができた。また、平成26年度には、疲労試験のワーストケース選定において、FEMに加えて静的荷重試験を加えることを検討するとともに、ワーストケース選定のためのフローチャート案を取り纏め提案することができた。

本研究の成果により提案されたワーストケース選定のためのフローチャート案について継続してし、

将来的に承認審査に導入することで、疲労試験のワーストケースの選定について合理的かつ効率的な判断ができ、歯科インプラント審査の問題点の一部が改善できるものと考えられる。これにより、我が国での審査基準など審査の考え方を再構築し、申請資料作成の効率化及び審査の迅速化を可能にすることが期待される

E . 結論

関連学会や大学等のアカデミア、独立行政法人医薬品医療機器総合機構、日本歯科材料工業協同組合の3者が密に連携して、現在の歯科インプラント承認審査の様々な課題を抽出、その解決策を検討し、国際標準に整合する有効性・安全性評価を提案することができた。

具体的には、平成25年度には、疲労試験のワーストケース選定の基本的考え方について、インプラント形状における長さ、径、アングルの有無、嵌合機構の形状に関して審査基準に関する提言を取り纏めることができた。また、平成26年度には、疲労試験のワーストケース選定において、FEMに加えて静的荷重試験を加えることを検討するとともに、ワーストケース選定のためのフローチャート案を取り纏め提案することができた。

本研究の成果により、疲労試験のワーストケースの選定については合理的かつ効率的な判断ができ、歯科インプラント審査の問題点の一部が改善できるものと考えられる。これにより、我が国での審査基準など審査の考え方を再構築し、申請資料作成の効率化及び審査の迅速化を可能にすることが期待される

F . 研究発表

1. 論文発表

Ogawa T, Vandamme K, Zhang X, Naert I, Possemiers T, Chaudhari A, Sasaki K, Duyck J. Stimulation of titanium implant osseointegration through high-frequency vibration loading is enhanced when applied at high acceleration. *Calcif Tissue Int.* 95(5):467-75, 2014.

Chatterjee M, Hatori K, Duyck J, Sasaki K, Naert I, Vandamme K. High-frequency loading positively impacts titanium implant osseointegration in impaired bone. *Osteoporosis International* 26(1):281-90, 2014.

Shigemitsu R, Yoda N, Ogawa T, Kawata T, Gunji Y, Yamakawa Y, Ikeda K, Sasaki K. Biological-data-based finite-element stress analysis of mandibular bone with implant-supported overdenture. *Comput Biol Med* 54:44-52,2014.

Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiya T, Nakamura S, Takeda Y, Dobaishi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato

N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R, Ogasawara K.

NKG2D(+) IFN- γ (+) CD8(+) T Cells Are Responsible for Palladium Allergy. *PLoS One.* 12;9(2):e86810, 2014.

Ikai H, Odashima Y, Kanno T, Nakamura K, Shirato M, Sasaki K, Niwano Y. In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide. *PLoS One.* 25;8(11):e81316, 2013.

2. 学会発表

大竹義雄、高橋 哲、山内健介、小山重人、佐々木啓一
当院歯科インプラントセンターにおける1年間の臨床統計
第34回日本口腔インプラント学会 東北・北海道支部学会, 2014/11/15-16, 山形

Ogawa T, Shibamoto A, Zhang X, Naert I, Sasaki K, Duyck J, Effect of low-magnitude and high-frequency loading on peri-implant bone healing and osseointegration in rats. *China-Japan-Korea Dental Science Symposium 2014,* 2014/11/8-9, China

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
松岡厚子	第3部 遺伝毒性試験	ISO/TC194 国内委員会	和英対訳 医療機器の製造販売承認申請等に必要 な生物学的安全性評価の基本的考え方について	薬事 日報社	東京	2012	80-93

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iwasaki Y, Ishihara K.	Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces.	Sci. Technol. Adv. Mater,	13	064101 (14pp)	2012
Inoue K, Inoue Y, Ishihara K.	Effects of dynamics of water molecules at hydrophilic polymer brush surfaces on protein adsorption behavior.	Trans. Mater. Res. Soc. Jpn,	37(3)	333-336	2012
Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A.	The effect of calcium ions incorporation into titanium surface by chemical treatment on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells	Journal of Biomed. Mater. Res. Part A,	101	2573-2585	2013
Sakata S, Inoue Y, Ishihara K.	Quantitative evaluation of interaction force between functional groups in protein and Polymer brush surfaces	Langmuir,	30	2745-2751	2014
Ikai H, Odashima Y, Kanno T, Nakamura K, Shirato M, Sasaki K, Niwano Y.	In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide	PLoS One,	8	e81316	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakata S, Inoue Y, Ishihara K.	Molecular interaction forces generated during the protein adsorption to well-defined polymer brush surfaces	Langmuir,	31	3108-3114	2015
Sakata S, Inoue Y, Ishihara K.	Nano-scale molecular interaction force measurement for analysis of protein adsorption on the surface	Trans. Mat. Soc. Japan,	39	185-188	2014
Shigemitsu R, Yoda N, Ogawa T, Kawata T, Gunji Y, Yamakawa Y, Ikeda K, Sasaki K.	Biological-data-based finite-element stress analysis of mandibular bone with implant-supported overdenture	Comput. Biol. Med.,	54	44-52	2014
Hoshihara T, Nikaido M, Tanaka M.	Characterization of the mechanisms of attachment of tissue-derived cell lines to blood-compatible polymers	Adv. Healthcare Mater.,	3	775-784	2014
Tanaka M, Sato K, Kitakami E, Kobayashi S, Hoshihara T, Fukushima K.	Design of biocompatible and biodegradable polymers based on intermediate water concept	Polym. J.,	47	114-121	2014